



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Análisis de la diversidad y estructura genética de
Cairina moschata “pato criollo” en los departamentos
de Piura y Amazonas utilizando marcadores
microsatélites**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Hennry Fernando MALLQUI MONTILLA

ASESORES

Jaime Roberto SÁNCHEZ VENEGAS

Eudosio Amancio VELI RIVERA

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mallqui, H. (2020). *Análisis de la diversidad y estructura genética de Cairina moschata “pato criollo” en los departamentos de Piura y Amazonas utilizando marcadores microsatélites*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	—
DNI o pasaporte del autor	47532373
Código ORCID de los asesores	0000-0002-2160-2428 0000-0002-9004-7739
DNI o pasaporte de los asesores	06120091 10609710
Grupo de investigación	—
Agencia financiadora	Perú Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA Proyecto 094_Pi: “Caracterización de los recursos zoogenéticos nativos y naturalizados de importancia para la seguridad alimentaria del Perú”
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en Perú, Lima, Lima, La Molina, Av. La Molina N° 1981 Coordenadas geográficas: Latitud: -12.075777 Longitud: -76.944308
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2017-2019
Disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:15 horas del 11 de marzo de 2020, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **HENRRY FERNANDO MALLQUI MONTILLA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 016-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Cairina moschata* “PATO CRIOLLO” EN LOS DEPARTAMENTOS DE PIURA Y AMAZONAS UTILIZANDO MARCADORES MICROSATÉLITES”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: APROBADO CON MENCIÓN HONROSA

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **HENRRY FERNANDO MALLQUI MONTILLA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:20 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 11 de marzo de 2020.

Dra. RINA RAMIREZ MESIAS
(PRESIDENTA)

Dr. JAIME SANCHEZ VENEGAS
(ASESOR)

Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(MIEMBRO)

Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

*Dedicado a mi abuela "Nely" Checa Cortes,
columna de la familia, siempre al lado de sus hijos,
y a mi tío Elvis Calle Checa,
sus palabras de motivación y perseverancia
siempre estarán presentes en mi memoria.*

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Leopoldo Javier Mallqui Checa y Nazareth Montilla Cauper, quienes han guiado mis pasos y siempre me han apoyado. A mi abuela Nely, mi tía Mirtha y mis hermanos Xavier y Michael, quienes toda la vida me han brindado su apoyo incondicional.
- Al ingeniero Eudosio Veli, quien me permitió participar en un proyecto de tamaño importancia, por la paciencia en el laboratorio y por todos los consejos durante la elaboración de la tesis.
- A la bióloga Wendy Acuña por confianza recibida, su orientación durante toda la parte experimental de la tesis y su paciencia hacia mi persona, profundamente agradecido.
- A la bióloga Claudia Yalta por dirigir con disciplina las actividades de laboratorio y por las pautas recibidas para redactar la tesis.
- A mi asesor, Dr. Jaime Sánchez, quien en todo momento estuvo pendiente a que no desistiera de esta investigación.
- Al INIA, entidad que me abrió sus puertas y dio facilidades para ejecutar el trabajo de campo y el uso de sus instalaciones para la parte experimental de la tesis.
- Al ingeniero Benjamin Depaz, quien ofreció su apoyo total al proyecto durante el trabajo de campo realizado en Amazonas.
- Al Dr. Julio Chávez y a Lenin Chumbe por apoyarme durante mis consultas constantes en el uso de herramientas bioinformáticas.
- A todas las personas con las que tuve la dicha de pasar el tiempo durante la parte experimental: La señora Iris, por su apoyo, guía y sobre todo paciencia; Alan, primer compañero, generador de debates y maestro de la comedia; Cristian y Lenin (otra vez), parte mentores, parte buenos amigos; Rosa, una gran amiga, siempre solidaria; Rolando, buen compañero, mejor extractor de ADN; Hector, Savina, Roger, a ambas Carla y Karla, Cecilia, Juan, Fernando, Andrea, Johan, Rubén... a todos, muchas gracias por las experiencias vividas dentro y fuera de laboratorio.

Esta tesis fue financiada por el **Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA en el marco del proyecto 094_Pi: “Caracterización de los recursos zoogenéticos nativos y naturalizados de importancia para la seguridad alimentaria del Perú”** y fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMOVA	Análisis de Varianza Molecular (Analysis of Molecular Variance)
AR	Alelos raros
AmR	Alelos muy raros
BIC	Bayesian information criterion (Criterio de información bayesiano)
°C	Grado Celsius
CENAGRO	Censo Nacional Agropecuario
CHAP	Provincia de Chachapoyas
cm	Centímetro
CNDQ	Provincia de Condorcanqui
DAPC	Análisis discriminante de componentes principales (Discriminant Analysis of Principal Components)
DL	Desequilibrio de ligamiento
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato (deoxyribonucleotide triphosphates)
EDTA	Ácido etilenodiaminetetracético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (United Nations Food and Agriculture Organization)
F_{IS}	Índice de endogamia (individuo – subpoblación)
F_{IT}	Índice de consanguinidad total (individuo – total)
F_{ST}	Índice de fijación (subpoblación – total)
GL	Grados de Libertad
H_e	Heterocigosidad esperada
H_o	Heterocigosidad observada
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
kg	Kilogramo
MCMC	Monte Carlo basado en Cadenas de Markov (Markov Chain Monte Carlo)

MRPN	Provincia de Morropón
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Mili Molar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PIC	Contenido de información polimórfica (Polymorphic Information Content)
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA)
RAM	Amplificación aleatoria de microsatélites (Random Amplified Microsatellites)
rpm	Revoluciones por minuto
RODM	Provincia de Rodríguez de Mendoza
SC	Suma de cuadrados
SSR	Secuencia simple repetida (Single Sequence Repeat)
SMM	Modelo de Mutación Escalonada (Stepwise Mutation Model)
p-value	Nivel de significancia
TE	Tris : EDTA
Ta	Temperatura de <i>annealing</i> o hibridación
U	Unidad
μL	Microlitro
μM	Micro Molar
URF	Unidad Relativa de Fluorescencia
UV	Ultravioleta
V	Voltios

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. La especie <i>Cairina moschata</i>	3
2.1.1. Origen, distribución y domesticación de la especie	3
2.1.2. Características morfológicas	4
2.1.3. Características ecológicas	5
2.1.4. Contexto actual	5
2.2. Marcadores moleculares	7
2.2.1. Microsatélites	7
2.2.2. Clasificación de microsatélites	8
2.2.3. Genotipificación de microsatélites por electroforesis capilar.....	8
2.2.4. Mejoramiento y eficiencia del genotipado de microsatélites	10
2.2.5. Estudios preliminares en patos criollos empleando marcadores microsatélites	11
2.3. Medición de la diversidad genética.....	12
2.3.1. Número de alelos (A)	13
2.3.2. Número efectivo de alelos (Ae)	13
2.3.3. Contenido de Información Polimórfica (PIC)	13
2.3.4. Alelos nulos	14
2.3.5. Heterocigosidad.....	15
2.3.6. Prueba de Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW)	15
2.3.7. Prueba de Desequilibrio de Ligamiento (DL)	16
2.3.8. Corrección de Bonferroni.....	16
2.4. Determinación de la estructura genética poblacional	17
2.4.1. AMOVA.....	17
2.4.2. Estadísticos F	18
2.4.3. Estadístico R.....	19

2.4.4.	Determinación de grupos genéticos	19
3.	HIPÓTESIS	22
4.	OBJETIVOS	22
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1.	Área de estudio	23
5.2.	Colecta de muestras	24
5.3.	Extracción de ADN genómico	25
5.4.	Verificación de calidad y cantidad de ADN	26
5.5.	Selección de los microsatélites	27
5.6.	Amplificación de los microsatélites	27
5.7.	Análisis de datos	30
5.8.	Análisis estadístico	31
5.8.1.	Análisis de la variabilidad genética	31
5.1.1.	Análisis de la estructura genética poblacional	32
6.	RESULTADOS	34
6.1.	Extracción de ADN	34
6.2.	Amplificación de SSR y determinación de los productos amplificados	34
6.3.	Parámetros indicativos de variabilidad genética	34
6.3.1.	Número de alelos	34
6.3.2.	Frecuencias alélicas y alelos raros	36
6.3.3.	Alelos nulos	48
6.3.4.	Contenido de Información Polimórfica (PIC)	49
6.3.5.	Heterocigosidad	50
6.3.6.	Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)	51
6.3.7.	Desequilibrio de ligamiento (DL)	52
6.4.	Análisis de la estructura poblacional	53
6.4.1.	AMOVA y Estadísticos F y R	53
6.4.2.	Asignación a grupos por probabilidad bayesiana	56
6.4.3.	Asignación a grupos por DAPC	58
7.	DISCUSIÓN	60
7.1.	Extracción de ADN a partir de plumas	61
7.2.	Amplificación de microsatélites	62
7.3.	Parámetros indicativos de variabilidad genética	63
7.4.	Análisis de estructura poblacional	69

8. CONCLUSIONES	73
9. RECOMENDACIONES	74
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de valores de PIC.	14
Tabla 2. Interpretación de valores de F_{ST} .	18
Tabla 3. Ubicación y cantidad de individuos muestreados en los departamentos de Piura y Amazonas.	24
Tabla 4. Selección de 23 cebadores utilizados para la amplificación de SSR en patos criollos.	28
Tabla 5. Número total de alelos de las poblaciones de Piura y Amazonas.	36
Tabla 6. Frecuencias de alelos raros y alelos muy raros en las poblaciones de Piura y Amazonas.	47
Tabla 7. Evaluación de alelos nulos.	48
Tabla 8. Estimación de heterocigosidad calculadas para las poblaciones de Piura y Amazonas utilizando 19 loci.	50
Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg evaluado para cada locus en las poblaciones de Piura, Amazonas y total.	51
Tabla 10. Pares de loci que mostraron desequilibrio de ligamiento entre las 171 asociaciones evaluadas en las poblaciones de Piura, Amazonas y total.	52
Tabla 11. AMOVA y Estadísticos F_{ST} y R_{ST} para los departamentos de Piura y Amazonas.	53
Tabla 12. AMOVA y Estadísticos F_{ST} y R_{ST} para las provincias de Piura y Amazonas.	54
Tabla 13. Matriz pareada de valores F_{ST} (debajo de la diagonal) y valores R_{ST} (encima de la diagonal) entre las provincias de Piura y Amazonas.	54

Tabla 14.	Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}) por departamento y total.	55
Tabla 15.	Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}) por provincias y estimación del coeficiente de consanguinidad total (F_{IT}).	56
Tabla 16.	Datos resaltando el mejor valor para K utilizando ParallelStructure y Corrsieve.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ilustración de individuos de <i>Cairina moschata</i> silvestres.	4
Figura 2. Distribución de poblaciones de patos criollos domésticos en el Perú.	6
Figura 3. Esquema de amplificación para el método de PCR utilizando la cola M13 (Fuente: Schuelke, 2000).	11
Figura 4. Ubicación geográfica de las zonas de muestreo en los departamentos de Piura y Amazonas.	23
Figura 5. Procedimiento de colecta de muestras biológicas.	25
Figura 6. Método de extracción a partir del cálamo de la pluma.	26
Figura 7. Electroferogramas registrados por el programa GeneMapper a partir de los amplificados de los marcadores microsatélites.	35
Figura 8. Frecuencias alélicas del marcador APH07.	37
Figura 9. Frecuencias alélicas del marcador APH13.	37
Figura 10. Frecuencias alélicas del marcador APL2.	38
Figura 11. Frecuencias alélicas del marcador APL11.	38
Figura 12. Frecuencias alélicas del marcador APL580.	39
Figura 13. Frecuencias alélicas del marcador APT004.	39
Figura 14. Frecuencias alélicas del marcador APT021.	40
Figura 15. Frecuencias alélicas del marcador APT025.	40
Figura 16. Frecuencias alélicas del marcador APT029.	41
Figura 17. Frecuencias alélicas del marcador AY285.	41
Figura 18. Frecuencias alélicas del marcador AY294.	42

Figura 19.	Frecuencias alélicas del marcador AY295.	42
Figura 20.	Frecuencias alélicas del marcador CADU24.	43
Figura 21.	Frecuencias alélicas del marcador CADU86.	43
Figura 22.	Frecuencias alélicas del marcador CAUD001.	44
Figura 23.	Frecuencias alélicas del marcador CAUD022.	44
Figura 24.	Frecuencias alélicas del marcador CAUD026.	45
Figura 25.	Frecuencias alélicas del marcador CmAAT16.	45
Figura 26.	Frecuencias alélicas del marcador CmAAT35.	46
Figura 27.	Frecuencias alélicas del marcador CmAAT38.	46
Figura 28.	Frecuencias alélicas del marcador CMO211.	47
Figura 29.	Evaluación del PIC en la población total.	49
Figura 30.	Estructuración de poblaciones domésticas de <i>C. moschata</i> a nivel de departamentos y provincias.	57
Figura 31.	<i>Output</i> generado a partir de las pruebas con Structure Selector y Corrsieve.	58
Figura 32.	Gráfico de las 155 muestras de patos criollos en los dos primeros factores discriminantes del DAPC.	59
Figura 33.	Probabilidad de membresía de cada individuo (a nivel de departamentos y provincias) a los 3 grupos genéticos inferidos por el DAPC.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Tabla 17. Datos pasaporte de los 155 individuos de la especie <i>Cairina moschata</i> muestreados.	92
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de plumas.	99
Anexo 3. Figura 34. Geles de agarosa al 1% del ADN total de <i>Cairina moschata</i> .	100
Anexo 4. Figura 35. Geles de agarosa al 2% de las diluciones de ADN (30 ng/ μ L) de <i>Cairina moschata</i> .	100
Anexo 5. Tabla 18. Información sobre los 29 marcadores elegidos para el análisis de la diversidad genética de <i>Cairina moschata</i> .	101
Anexo 6. Protocolos de amplificación mediante PCR múltiplex para 23 marcadores SSRs.	104
Anexo 7. Programas de amplificación para los PCR múltiplex.	107
Anexo 8. Tabla 19. Registro de las frecuencias alélicas en los 23 marcadores SSRs en las poblaciones de Piura y Amazonas.	109
Anexo 9. Figura 36. Análisis del valor de BIC para el agrupamiento por el método de k-medias.	114
Anexo 10. Figura 37. Gráfico de dispersión de la validación cruzada DAPC.	114
Anexo 11. Tabla 20. Pertenencia de cada individuo a los grupos hallados por el DAPC.	115
Anexo 12. Figura 38. Mapa de ligamiento genético en Kosambi centimorgans para <i>Anas platyrhynchos</i> .	119

RESUMEN

Con el propósito de contribuir a la conservación de recursos zoogenéticos para la seguridad alimentaria en el Perú, se realizó el análisis de la diversidad genética y estructuración de poblaciones de patos criollos domésticos (*Cairina moschata*), pertenecientes a distintos centros poblados de los departamentos de Piura y Amazonas. A partir de muestras de plumas de 155 individuos colectados, se evaluaron 23 marcadores microsatélites a través de los sistemas de PCR múltiplex y de electroforesis capilar. Se registraron 19 loci altamente informativos ($PIC > 0.23$). Se revelaron un total de 201 alelos con una media de 8.74 por locus, mientras que la heterocigosidad esperada total fue de 0.613, lo que indica un moderado nivel de polimorfismo y diversidad genética. La prueba de Hardy-Weinberg reveló un alto porcentaje de loci en desequilibrio H-W (73.7%) para la población total, mientras que la prueba de desequilibrio de ligamiento mostró una baja proporción entre todos los pares de loci analizados (8.77%). Se detectaron entre 2 a 3 grupos genéticos, sin embargo su nivel de diferenciación fue bajo al ser cotejado con los estadísticos F (0.047) y R (0.044), lo que indica la ausencia de estructura genética. Los resultados indicaron que los loci microsatélite utilizados fueron eficaces para determinar la diversidad genética de las poblaciones de patos criollos domésticos de ambas regiones del Perú y podrían proporcionar información para futuras estrategias de reproducción.

Palabras clave: Pato criollo, marcador microsatélite, electroforesis capilar, diversidad genética, estructura genética.

ABSTRACT

In order to contribute to the conservation of animal genetic resources for food security in Peru, the analysis of genetic diversity and genetic structure of domestic Muscovy duck (*Cairina moschata*) populations belonging to different settlements of the region of Piura and Amazonas was carried out. From feather samples of 155 individuals collected, 23 microsatellite markers were evaluated through a multiplex PCR and capillary electrophoresis. 19 highly informative loci were registered ($PIC > 0.23$). A total of 201 alleles were revealed with an average of 8.74 per locus, whereas the total expected heterozygosity was 0.613, indicating a moderate level of polymorphism and genetic diversity. The Hardy-Weinberg test showed a high percentage of loci in H-W disequilibrium (73.7%) for the total population, whereas the linkage disequilibrium test showed a low proportion among all pairs of loci analyzed (8.77%). From 2 and 3 genetic groups were detected, however their level of differentiation was low when compared with the F (0.047) and R (0.044) statistics, indicating absence of genetic structure. The results indicated that the microsatellite loci used were effective to determine the genetic diversity of the domestic Muscovy ducks populations in both regions of Peru and might provide information for future breeding strategies.

Keywords: Muscovy duck, microsatellite markers, capillary electrophoresis, genetic diversity, genetic structure

1. INTRODUCCIÓN

El pato criollo *Cairina moschata*, también conocido como pato criollo o *Muscovy*, es una anátida característica de las regiones tropicales de América del Sur. La crianza de su forma doméstica es una de las actividades de origen prehispánico que persisten hasta nuestros días en el norte y oriente peruano, lo cual ha elevado la importancia de este recurso zoogenético, el cual posee una extensa distribución geográfica (CENAGRO, 2012). Esta especie ha sido relegada en áreas de producción avícola intensiva como un animal menor; sin embargo, debido a su rusticidad, fácil adaptabilidad a todo tipo de ambiente de crianza, crecimiento rápido así como la menor presencia de problemas de salud, es un ave apreciada en sistemas de crianza familiar, por lo que adquiere gran relevancia como parte de la seguridad alimentaria (FAO, 2007). El potencial productivo del pato criollo radica principalmente en la carne y los huevos, donde ha tenido acogida en la venta local y el consumo familiar (Ciriaco, 1999). Debido a que existen pocos programas de manejo para estas aves, la caracterización genética es un aspecto básico para evitar la pérdida de caracteres de interés (Toro et al., 2011).

Los marcadores moleculares han permitido la identificación genética para la caracterización de distancias entre razas y para ayudar a comprender características de producción como de adaptación (Delgado et al., 2012). Entre las distintas clases de marcadores, los microsatélites (SSR) son los utilizados con mayor frecuencia a causa de sus características como la herencia codominante y la alta tasa de mutación, lo cual facilita la evaluación de la diversidad genética tanto dentro como entre las poblaciones (Weigend y Romanov, 2001).

El estudio de la diversidad genética en patos ha tenido como mayor exponente al pato Pekín *Anas platyrhynchos*, como consecuencia de su alta valoración en el continente asiático. Además, una gran cantidad de loci evaluados en pato Pekín utilizando marcadores microsatélites también han sido aplicados en el pato criollo como parte de la evaluación de transferibilidad de marcadores a distintas especies de la familia Anatidae (Maak et al., 2000; Huang et al., 2005; He et al., 2008; Su y Chen, 2009). Con

base en dichos estudios, en años recientes se han realizado investigaciones acerca de la genética del pato criollo en el Perú, a partir de muestras obtenidas tanto del sector avícola comercial (Conto, 2014) como de zonas de crianza familiar y estaciones experimentales agrarias (Acuña, 2016) y mediante el uso de marcadores microsatélites previamente evaluados en *A. platyrhynchos* y *C. moschata*. No obstante, otras regiones del país poseen una gran cantidad de patos criollos domésticos, por lo que es necesario continuar con el estudio de dichas poblaciones.

La presente tesis se abocó al conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de patos criollos domésticos procedentes de las regiones de Piura y Amazonas utilizando 23 marcadores microsatélites. Como parte del proceso de investigación de los recursos zoogenéticos presentes en el Perú, se espera que los resultados favorezcan al desarrollo de programas que permitan la conservación del acervo genético del pato criollo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La especie *Cairina moschata*

2.1.1. Origen, distribución y domesticación de la especie

El pato criollo *Cairina moschata* (Linnaeus, 1758) se encuentra clasificado dentro del:

Phylum Chordata

Clase Aves

Orden Anseriformes

Familia Anatidae

Genero *Cairina* (Fleming, 1822)

La familia Anatidae está conformada por patos, cisnes y gansos y es la mejor estudiada de las familias que comprenden el orden Anseriformes (Livezey, 1986). El interés en este grupo de aves radica en su estrecha relación con los humanos en actividades tales como la caza, la domesticación y la avicultura (Carboneras, 1992); además de servir como especies modelo en estudios de comportamiento animal (Martin, 1998).

Su distribución abarca ambas costas de México, extendiéndose hacia el sur a través de América Central y los bosques tropicales de América del Sur, incluyendo zonas templadas de los Andes en Colombia, Ecuador y el este de Perú, y llegando hasta el norte de Argentina y Uruguay (Donkin, 1989). Sus hábitats preferidos son los ríos, lagunas, manglares y espacios similares a altitudes relativamente bajas asociadas con bosques tropicales. Son consumidores versátiles, se alimentan de variedad de semillas, tubérculos e invertebrados y obtienen su alimento por medios tales como filtración de materia orgánica, recolección o picoteo (Baldassarre, 2014).

El proceso de domesticación de esta especie se puede evidenciar en múltiples culturas precolombinas a través de distintas manifestaciones como la cerámica o la plumería; así también, patrones ecológicos del pato criollo relacionados con la ingesta de insectos están asociados con su crianza intensiva por parte de grupos humanos ya establecidos en un territorio. Sin embargo, la escasa y dispersa evidencia ósea significativa,

estrechamente correspondida con el aspecto etnocultural de este proceso, no permite determinar un centro específico de domesticación (Angulo, 1998).

2.1.2. Características morfológicas

Esta especie en su forma silvestre posee una morfología distintiva dentro de la familia Anatidae: presenta alas bastante anchas, redondeadas, colas alargadas, patas relativamente cortas de color negro y pico rosado con manchas negras; además, exhiben una coloración iridiscente en su plumaje (Madge y Burn, 1988). Se destacan por un marcado dimorfismo sexual, donde los machos pueden alcanzar longitudes de 84 cm y pesos de 4 kg mientras que las hembras solo llegan hasta los 66 cm de longitud y pesos de 1,5 kg (Johnsgard, 2010). Los adultos poseen un plumaje negro grisáceo en el lado ventral, negro con iridiscencia verde y púrpura en el lado dorsal y un área blanca sobre el manto del ala, que sobresale más en las hembras. Los machos muestran piel descubierta alrededor y delante de los ojos pero con la edad aparecen pequeñas carúnculas alrededor de la región orbital hasta la base del pico, mientras que las caras de las hembras son en su mayoría emplumadas. Los juveniles, en contraste, presentan plumaje menos iridiscente en la zona dorsal y nula o poca cantidad de plumas coberteras alares blancas hasta el final del primer año (Hoffmann, 2005) (Figura 1).

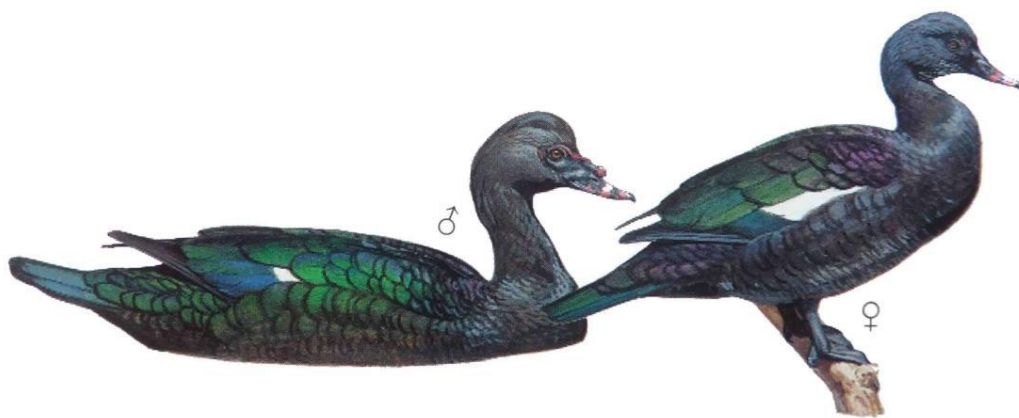


Figura 1. Ilustración de individuos de *Cairina moschata* silvestres (Fuente: Schulenberg et al., 2006)

2.1.3. Características ecológicas

Por lo general son solitarios, pueden asociarse en parejas o en pequeños grupos no mayores a media docena de individuos; no se asocian con otras especies. Los apareamientos ocurren de forma promiscua y, excepto durante un período limitado de receptividad femenina, existe poca asociación estrecha entre los sexos. La puesta de huevos suele ocurrir durante las estaciones de lluvia, donde las hembras ponen de 8 a 10 huevos en nidos ubicados en los huecos de los árboles a alturas de 3 a 20 metros, y cuyo periodo de incubación es de aproximadamente 35 días (Johnsgard, 2010).

2.1.4. Contexto actual

La crianza del pato criollo está extendida en todo el mundo. En países del sudeste asiático como China, Indonesia y Vietnam registra un aproximado de 50 razas (FAO, 2014). En muchos países asiáticos, así como en Europa, individuos domésticos de *C. moschata* suelen ser cruzados con patos Pekín, cuya descendencia es un híbrido estéril llamado pato *mulard* o “mula”, el cual goza de alta demanda debido a su carne baja en grasas y a que es empleado en la fabricación de paté de hígado graso o *foie gras* (Marie-Etancelin et al., 2008).

Esta especie ha obtenido una importancia económica cada vez mayor como carne magra en comparación con otros patos, ya sea en sistemas extensivos tradicionales o en sistemas de crianza intensivos. Además, debido a su buen comportamiento de alimentación y crianza, es capaz de adaptarse fácilmente a casi todos los ecosistemas (Grimaud Freres, 1989; Narvaiza, 2008).

En el Perú, la crianza del pato doméstico es una de las actividades de origen prehispánico que persisten en el norte peruano, proveniente desde las culturas precolombinas como la Moche (Gamboa, 2017), esta región se ha caracterizado por la crianza extensiva de esta especie y utilizada sobre todo para autoconsumo durante celebraciones patronales. En el resto del país esta ave fue considerada un recurso marginal y sustituible debido a la oferta de otras especies y razas exóticas; sin embargo,

debido a las políticas de Estado implementadas en las últimas décadas, así como al desarrollo del sector agrario, se ha observado que la producción de carne de aves, donde también se incluye al pato criollo, aumentó un 51% entre los años 1995-2001 (INIA, 2004). Actualmente el INIA es la entidad responsable de las investigaciones acerca de animales domésticos nativos o introducidos, por medio de sus estaciones experimentales agrarias. El IV CENAGRO registró que la crianza de patos criollos es una actividad productiva presente en gran parte del territorio peruano, donde el norte y oriente del país son las zonas geográficas que contienen a las mayores poblaciones de esta especie (Figura 2).

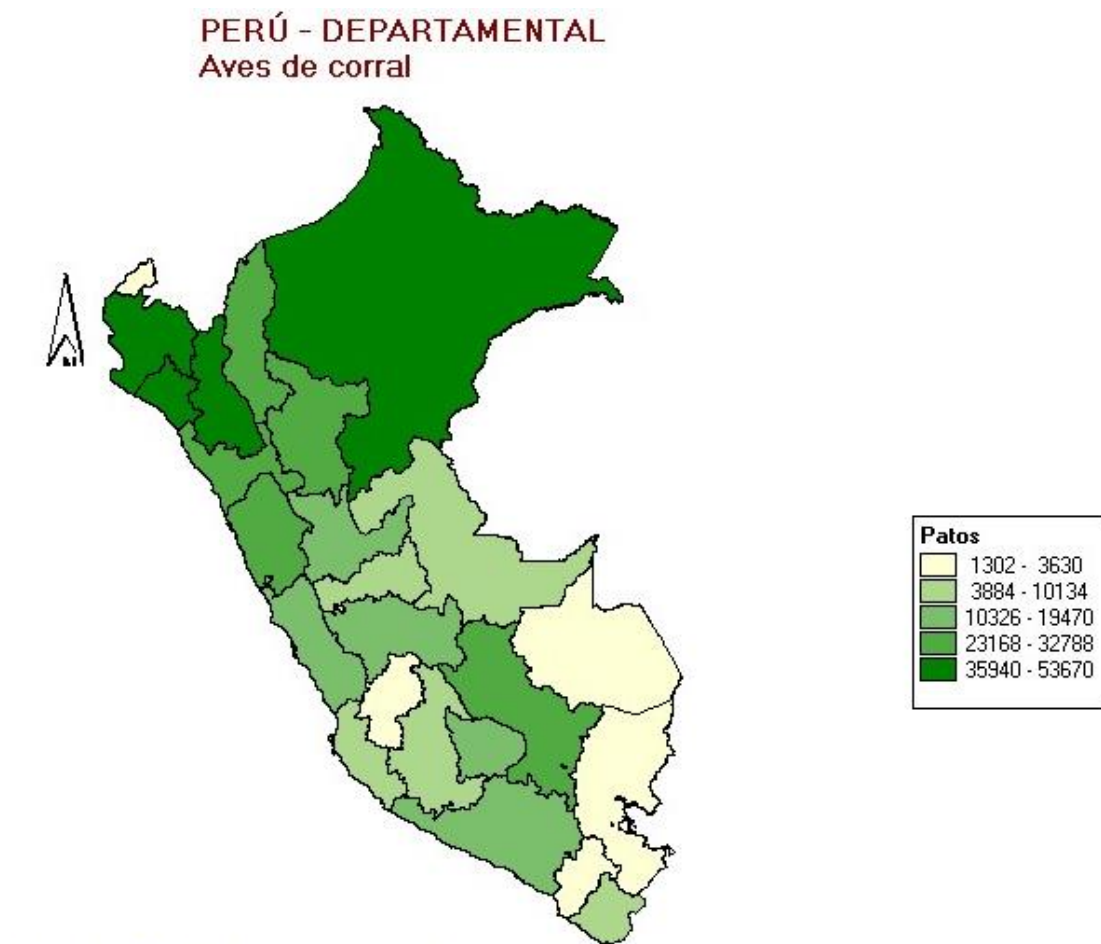


Figura 2. Distribución de poblaciones de patos criollos domésticos en el Perú.
(Fuente: PERÚ, INEI IV Censo Nacional Agropecuario, 2012)

2.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas valiosas que permiten la detección o diferenciación de genotipos, cuya transmisión entre generaciones es factible de seguir. Estos pueden ser segmentos de ADN o genes los cuales generan patrones monomórficos y polimórficos y que se heredan de forma mendeliana. El interés por detectar variación molecular ha conducido a un enorme incremento en el tipo y número de marcadores disponibles, los cuales son de utilidad en múltiples campos: estudios de variabilidad genética a nivel poblacional, filogenética, construcción de mapas genómicos, así como el posible diagnóstico de enfermedades hereditarias (Klug et al., 2005). Mediante el uso de datos moleculares es posible una aproximación adecuada al entendimiento de los procesos que configuran la estructura genética de una población al proporcionar información sobre la distribución de la diversidad génica actual y sobre la historia genético-evolutiva (Vallejo, 2008). Entre los más utilizados se encuentran: AFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), SSR (Secuencia simple repetida) o microsatélites y SNP (Polimorfismo de nucleótido simple) (Pérez, 1996).

2.2.1. Microsatélites

Los microsatélites o SSR son secuencias de ADN conformadas por 1 a 6 nucleótidos que se repiten en tándem, los cuales están diseminados ampliamente en el genoma de procariotas y eucariotas (Tautz y Renz, 1984; Tóth et al., 2000). Los microsatélites han sido aplicados en una gran cantidad de investigaciones a causa de su elevado nivel de polimorfismo, herencia codominante, abundancia y distribución en el genoma así como la facilidad para su interpretación (Weissenbach y Dib, 1992; Provan et al., 1999; Zane et al., 2002).

2.2.2. Clasificación de microsatélites

Los microsatélites pueden clasificarse de manera variada de acuerdo al patrón de repetición que presenten, el número de nucleótidos por unidad de repetición o su localización dentro del genoma. En el primer caso, los microsatélites han sido clasificados con los siguientes términos (Weber, 1990; Wang et al., 2009): perfectos simples o puros: unidades de la misma longitud; perfectos compuestos: presentan dos o más repeticiones simples adyacentes; imperfectos simples o complejos: contienen unidades repetidas en bloque discontinuadas por secuencias; e imperfecto compuesto o hipervariables complejos: presentan una gran cantidad de alelos sin consenso que difieren tanto en secuencia como en tamaño. Estos últimos no son recomendables debido a su gran dificultad de genotipificación (Urquhart et al., 1994).

De acuerdo a la cantidad de nucleótidos presentes por unidad de repetición, los SSR se pueden categorizar desde 1 (mononucleótidos) hasta 6 nucleótidos (hexanucleótidos) (Kalia et al., 2011), donde las repeticiones de 5 y 6 nucleótidos son menos frecuentes, mientras que las que presentan 4 nucleótidos (tetranucleótidos) son frecuentemente utilizados por los siguientes motivos (Santos et al., 1993; Walsh et al., 1996; Bacher et al., 1999):

- El pequeño tamaño del alelo posibilita su uso en sistemas de amplificación múltiplex, inclusive con muestras de ADN que se presentan degradadas.
- Disminuye la formación de productos no específicos en la PCR por causa del deslizamiento de la polimerasa, aquellos denominados *stutter* o picos tartamudos, lo que favorece la interpretación de resultados.

2.2.3. Genotipificación de microsatélites por electroforesis capilar

La técnica de electroforesis capilar permite separar diferentes moléculas presentes en una disolución bajo la influencia de un campo eléctrico espacialmente uniforme a través de un capilar. Los equipos de electroforesis capilar, conocidos de igual forma como secuenciadores automáticos, presentan altos costos; no obstante, poseen varias

ventajas para el análisis de ADN, de las cuales destacan: 1) es un método de alta sensibilidad, por lo que requiere poca cantidad de muestra, 2) el proceso automatizado permite que el análisis ocurra de forma simultánea durante la inyección, separación y detección de fragmentos, por lo que la obtención de resultados es más rápida, fácil y precisa, 3) el pequeño consumo de reactivos, 4) comparado con técnicas tradicionales, posee la capacidad de analizar mayor variedad de muestras y 5) provee información cuantitativa mediante electroferogramas que son obtenidos al final de la corrida de forma electrónica (Deyl et al., 1998; Butler, 2005).

Además, es necesario utilizar fluoróforos de colores así como marcadores alélicos en un proceso de genotipificación. Entre los fluoróforos más frecuentes tenemos: 6-FAM (azul); VIC (verde), NED (amarillo), PET (rojo), entre otros. En el caso de los marcadores alélicos se encuentran reservados los fluoróforos LIZ (anaranjado) y ROX (anaranjado). (Culley et al., 2013). Los fluoróforos emiten una luz (400 a 600 nm) al ser excitados por un láser, la cual es absorbida mediante un mecanismo fotosensible; luego, a través de filtros ópticos, se produce la separación del espectro con el fin de distinguir la emisión entre fluoróforos distintos. La emisión de distintos haces de luz posteriormente se transforman a una señal electrónica que se expresa en Unidades Relativas de Fluorescencia (URFs). Esta información se transfiere a un computador para su procesamiento, el cual puede visualizarse como electroferogramas, donde un pico representa un fragmento. Distintos colores son asignados a los conjuntos de picos que aparecen, estos colores dependen de la elección de fluoróforos; asimismo, se puede obtener el tamaño de cada pico (en pares de bases) así como su área y altura, los cuales expresarán el número de copias amplificadas (Whatley, 2001).

Por otro lado, el uso de un marcador alélico tiene como finalidad ser un patrón de medida para los loci microsatélite, lo cual es transcendental para determinar de forma precisa los genotipos examinados así como para el registro de alelos nuevos o raros (Butler et al., 2005).

2.2.4. Mejoramiento y eficiencia del genotipado de microsatélites

2.2.4.1. PCR múltiplex

La Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiplex es una variante de PCR convencional que permite amplificar simultáneamente en un único tubo distintos cebadores (Henegariu et al., 1997; Beja-Pereira et al., 2009), a causa de esto brinda varias ventajas, entre las que destacan: 1) los amplicones funcionan como control interno y pueden revelar falsos negativos, 2) la intensidad de las bandas funcionan como un buen indicador de la calidad de ADN molde, 3) se reduce el coste por reactivo así como el tiempo de preparación (Edwards y Gibbs, 1994; Markoulatos et al., 2002).

2.2.4.2. Cola M13

El uso de la cola M13 está basado en la construcción de cebadores *forward* con una secuencia añadida en el extremo 5' equivalente al cebador universal M13 (TGTAACGACGGCCAGT), que estará marcado por un fluoróforo (Oetting et al., 1995). El cebador elaborado proporciona una secuencia complementaria al cebador universal M13, lo que permite que en ciclos posteriores de la PCR se generen productos que pueden ser detectados en un equipo de electroforesis capilar, y en consecuencia las bandas de SSR son separadas mediante paneles conformados por distintos colores, los cuales permiten realizar múltiples reacciones de amplificación, debido a que en un mismo fluorescente es posible combinar varios cebadores si se realizan los ajustes necesarios a las temperaturas de *annealing* de la PCR, lo cual optimiza los tamaños de los productos (Figura 3), la evaluación de las combinaciones son realizadas mediante un capilar con una disociación de tamaño estandar, lo que permite el cálculo aproximado del tamaño de la banda. La elección de esta técnica durante la PCR constituye una gran reducción de costos debido a que no es necesario utilizar una gran cantidad de secuencias durante el proceso de fluoromarcado (Schwengel et al., 1994; Schuelke, 2000; Londoño, 2011).

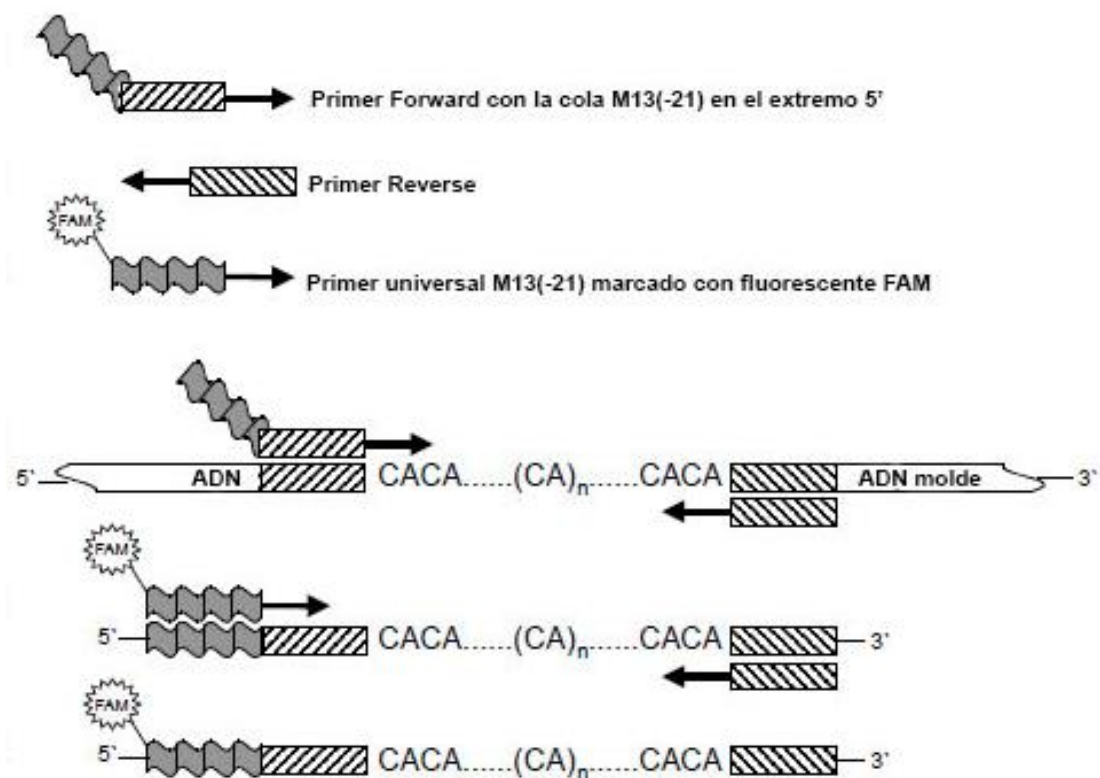


Figura 3. Esquema de amplificación para el método de PCR utilizando la cola M13 (Fuente: Schuelke, 2000).

2.2.5. Estudios preliminares en patos criollos empleando marcadores microsatélites

Los estudios realizados en patos Pekín utilizando marcadores microsatélites han servido como pruebas de transferibilidad de dichos marcadores en patos criollos, entre ellos se encuentran:

- Maak et al. (2003) aislaron y caracterizaron 18 loci microsatélite para el pato Pekín y evaluaron su aplicabilidad en distintas especies de anátidas. Un total de 17 marcadores amplificaron en catorce individuos de *C. moschata* domésticos no relacionados procedentes de mercados de la localidad de Stolle (Alemania), de los cuales 11 fueron polimórficos.
- Christel et al. (2006) aislaron 158 marcadores microsatélites con patrones di- y tetranucleótido, luego fueron evaluados en ocho individuos de pato Pekín y ocho de pato criollo no relacionados procedentes del Instituto Nacional de

Investigación Agronómica de Francia (INRA), de los cuales 77 amplificaron tanto en pato Pekín como en pato criollo y 13 amplificaron solo en pato criollo.

- Ahmadi et al. (2007) evaluaron 12 marcadores microsatélite en poblaciones de patos criollos en el norte de Irán. Se amplificaron un total de 10 loci, la baja heterocigosidad media fue atribuida al bajo número de alelos presentes en la población.

Stai y Hughes (2003) desarrollaron 7 loci microsatélites a partir de *C. moschata*, de los cuales 4 resultaron polimórficos. Reportaron una alta diversidad genética en la población silvestre; sin embargo, reportaron baja diversidad al evaluar dichos marcadores polimórficos en dos poblaciones domesticas de pato criollo.

En el Perú son recientes estudios moleculares realizados en patos criollos domésticos. El estudio realizado por Conto (2014) empleó seis loci microsatélite polimórficos para evaluar poblaciones domesticas de los departamentos de Piura y Lambayeque, donde encontró un nivel de diversidad genética bajo a moderado. Por otro lado, el trabajo realizado por Acuña (2016) utilizó 18 marcadores microsatélites para dos poblaciones ubicadas en las regiones de San Martín y Lambayeque; se reportó que el polimorfismo genético y la diversidad genética fueron moderados; mientras que, de acuerdo a los análisis de estadísticos F y R, la estructura genética fue baja a moderada.

2.3. Medición de la diversidad genética

La diversidad genética hace referencia a la diferencia de alelos así como de genotipos que pueden presentarse en grupos sujetos a análisis, las cuales pueden ser especies o poblaciones. La diversidad genética se refleja en las diferencias entre individuos y sus distintas características físicas. La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones se adapten al cambio ambiental (Frankham et al., 2002).

Para la evaluación de la diversidad genética se requiere una variedad de métodos moleculares y cuantitativos, como pueden ser el número de alelos, el número efectivo de alelos en un locus y la heterocigosidad observada y esperada.

2.3.1. Número de alelos (A)

Es un estadístico que indica el conjunto de alelos distintos en un locus presente en una población. La sumatoria de todos los alelos estudiados (A) es obtenido por:

$$A = \sum a_j$$

Donde a_j : Número de alelos presente en un locus j

Debe tomarse en cuenta el tamaño de la población ya que la posibilidad de identificar alelos raros o alelos muy raros aumenta mientras más grande sea la población (Kimura, 1983). En consecuencia, en estudios de variabilidad se considera útil a este estadístico (Aranguren-Méndez et al., 2005).

2.3.2. Número efectivo de alelos (Ae)

Es una medida que muestra la probabilidad en la cual dos alelos de un locus, escogidos aleatoriamente en una población, sean idénticos por descendencia. En caso que todos los alelos sean frecuentes de forma equivalente, Ae sería correspondiente a la heterocigosidad. Esta medida corresponde al inverso de la frecuencia esperada de homocigotos en la población (Frankham et al., 2002) y se calcula mediante la expresión:

$$Ae = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}$$

Donde p_i : Frecuencia del alelo i

H_e : Heterocigosidad esperada

2.3.3. Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El PIC es una estimación de la diversidad que permite evaluar la calidad y el nivel de información en un marcador según su nivel de polimorfismo y mide la capacidad discriminatoria de los loci, en dependencia del número de alelos y la frecuencia de cada

alelo en el locus marcador. Su valor se consigue al multiplicar la probabilidad de cada posible cruzamiento por la probabilidad de su valor informativo.

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 - \sum (2p_i^2 p_j^2)$$

Donde p_i : Frecuencia del alelo i
 p_j : Frecuencia del siguiente alelo j

La diversidad genética total (H) es representada por el valor promedio de este índice y muestra un rango de valores entre el 0 y 1 (Botstein et al., 1980) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de valores de PIC.

PIC > 0.5	Altamente informativo
0.25 < PIC < 0.5	Razonablemente informativo
PIC < 0.25	Ligeramente informativo

2.3.4. Alelos nulos

Un alelo nulo es cualquier alelo que no puede ser detectado en ensayos de identificación de genotipos en un locus particular. Con loci de microsatélites, un alelo nulo ocurre con mayor frecuencia debido a mutaciones en uno o ambos sitios de unión del cebador, suficientes para evitar la amplificación efectiva del alelo. Otras causas de la generación de alelos nulos son la amplificación diferencial de alelos de tamaño variable (Wattier et al., 1998) o la falla de la PCR por la baja calidad del ADN molde (Gagneux et al., 1997). La presencia del exceso de homocigotos con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg puede ser consecuencia de la detección de un alto número de alelos nulos (Allendorf y Luikart, 2007). El cálculo de esta frecuencia se obtiene a través de algoritmos que toman como base las frecuencias observadas y esperadas de los genotipos (Van Oosterhout et al., 2004).

2.3.5. Heterocigosidad

La heterocigosidad es la proporción de individuos en una población que presenta diferentes alelos para un mismo locus. En el caso de la heterocigosidad observada (H_o) se define como la sumatoria de las frecuencias de los heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci:

$$H_o = \sum_{i=1} H_i$$

Donde H_i : Probabilidad de heterocigosidad en el locus i

N : Total del número de marcadores usados.

Por otra parte, la heterocigosidad esperada (H_e), representa la probabilidad de que dos alelos elegidos aleatoriamente de una población sean distintos entre sí (Crow y Kimura, 1970). Se calcula a partir de las frecuencias alélicas que asume el equilibrio Hardy-Weinberg (Nei, 1987).

$$H_e = \frac{2N}{2N - 1} \left[1 - \sum_{j=1}^1 p_j^2 \right]$$

2.3.6. Prueba de Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW)

El EHW es un modelo teórico, utilizado en genética de poblaciones, en el cual se establece que en determinada población cumple con ciertas condiciones: a) ausencia de selección natural, b) ausencia de inmigración, c) tamaño efectivo infinito de la población, d) tasas de mutación despreciables, y e) cruzamientos al azar. De ser así, tanto las frecuencias alélicas como las frecuencias genotípicas seguirán un patrón constante (Freeland et al., 2005; Pierce 2009).

A causa de que el conjunto de fuerzas evolutivas invalida el cumplimiento mínimo de alguno de los supuestos, esta prueba se encarga de estimar la magnitud de la desviación del equilibrio. En el caso de que la prueba de equilibrio revele una desviación

significativa ($p\text{-value} < 0.05$), las posibles causas apuntarían al exceso de homocigotos o a la frecuencia de alelos nulos (Edwards et al., 1992; Guo y Thompson, 1992).

2.3.7. Prueba de Desequilibrio de Ligamiento (DL)

El DL se constituye como la asociación no aleatoria de alelos en diferentes loci en una población, si adicionalmente la asociación alélica se mide en el mismo cromosoma se considera una medida de ligamiento de los loci genéticos. La selección de dos o más loci no ligados o la reciente mezcla de poblaciones con diferentes frecuencias gaméticas puede influir en el desequilibrio (Mueller, 2004). En general, los modelos genéticos poblacionales exhiben un comportamiento mucho más simple cuando no hay DL, es decir, equilibrio de ligamiento. Por otro lado, cuando hay una variación de DL dentro de una región, esta información se puede usar para estimar la variación regional de la tasa de recombinación (McVean et al., 2004). También existe una relación causal de DL con el tamaño de la población, la selección natural y la mutación.

2.3.8. Corrección de Bonferroni

Cuando se llevan a cabo simultáneamente una gran cantidad de pruebas estadísticas, cada comparación tendrá un valor α (grado de confianza) individual, mientras que para el conjunto de todas las comparaciones el valor α general crece con la adición de cada nueva prueba, lo que puede llevar a que ocurran inferencias erróneas. El procedimiento conocido como corrección de Bonferroni (CB) realiza el ajuste del valor α para controlar el número de comparaciones con el objetivo de evitar una gran cantidad de falsos positivos (Allendorf y Luikart, 2007). El nuevo valor de α se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$CB = \frac{0.05}{k}$$

Donde k : Total de pruebas independientes

Este procedimiento cerciora que la posibilidad general de rechazar una hipótesis nula verdadera (conocido como error de tipo I) es aún menor a 0.05.

2.4. Determinación de la estructura genética poblacional

La estructura poblacional se desarrolla dentro de una especie cuando se aparta de la panmixia y forma subpoblaciones entre las cual se impide el intercambio a través de la dispersión o el apareamiento, produciendo pérdida de la diversidad genética (Colonna et al., 2009; Waples y Gaggiotti, 2006). Se necesitan identificar diferencias considerables en las frecuencias alélicas entre las poblaciones si el propósito es demostrar que las mismas se consideren estructuradas, como consecuencia de la falta de flujo génico. Por el contrario, si no se detectan diferencias en las frecuencias alélicas o son muy pocas, esto es un indicativo de una baja estructura genética, lo cual significa que el flujo génico funciona como una fuerza evolutiva que mantiene unificadas como un todo evolutivo a las especies (Eguiarte et al., 2010).

2.4.1. AMOVA

Es un modelo estadístico utilizado para estimar la diferenciación entre las poblaciones directamente a partir de datos moleculares. Está basado en un método jerárquico de variación genética que refleja la correlación entre las poblaciones y regiones, así también produce estimaciones de componentes de varianza análogos a los estadísticos F. La implementación del AMOVA requiere una matriz compuesta por las distancias genéticas entre los individuos con el fin de cuantificar la contribución de varios niveles de estructura genética de las poblaciones, donde se considera como hipótesis nula (H_0) que no existe diferenciación entre individuos o grupos de individuos y que las diferencias observadas se deben a un muestreo aleatorio (Excoffier et al., 1992). Además, al realizar múltiples permutaciones, es posible conseguir una estimación del valor acorde a lo que se espera si la hipótesis nula es verdadera. El AMOVA proporciona un marco general para el análisis de la estructura poblacional (Meirmans, 2006).

2.4.2. Estadísticos F

Hartl y Clark (1997) definen a los estadísticos F como la partición de la diversidad genética en la población a diferentes niveles jerárquicos: dentro de subpoblaciones (I), entre subpoblaciones (S) y en el conjunto de subpoblaciones (T). En función de las frecuencias alélicas, Wright (1950) definió los estadísticos F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} .

- F_{IS} o coeficiente de endogamia: Calcula la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones respecto a las esperadas en términos de exceso o déficit de heterocigotos. Es decir, estima la posibilidad de que dos alelos sean iguales por descendencia en un individuo en relación a la subpoblación. Su rango oscila entre -1 y 1, donde un índice negativo representa el exceso de heterocigotos y un índice positivo, la deficiencia de ellos.
- F_{ST} o coeficiente de fijación: Índice que representa un efecto de endogamia que surge en las subpoblaciones en relación con la población total de la que forman parte. Mide la reducción de la heterocigosidad de una subpoblación debido a la deriva genética y al apareamiento aleatorio en una población finita. Su rango oscila entre 0 y 1, donde el valor 0 indica la ausencia de divergencia genética mientras que el valor 1 manifiesta la fijación para alelos alternos en diferentes subpoblaciones (Tabla 2).

Tabla 2: Interpretación del índice de F_{ST} .

$F_{ST} > 0.25$	Diferenciación genética muy grande
$0.15 < F_{ST} < 0.25$	Diferenciación genética grande
$0.05 < F_{ST} < 0.15$	Diferenciación genética moderada
$F_{ST} < 0.05$	Diferenciación genética pequeña

- F_{IT} o coeficiente de consanguinidad total: Permite estimar la posibilidad en la cual dos alelos correspondientes al mismo locus sean equivalentes por descendencia en relación al conjunto de subpoblaciones o metapoblación. Su rango varía entre -1 y 1, lo que representa el exceso o déficit de heterocigotos.

Asimismo, la reducción de heterocigosidad se atribuye a los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones (F_{IS}) así como a los efectos de la propia subdivisión (F_{ST}).

2.4.3. Estadístico R

Los microsatélites se caracterizan por un proceso de mutación conocido como *Stepwise Mutation Model* (SMM) que causa preferentemente cambios escalonados del número de repeticiones y, por tanto, en el tamaño del alelo. En consecuencia, la diferencia de tamaño entre alelos puede ser informativa. Slatkin (1995) formuló un método de diferenciación genética (R_{ST}) análogo al F_{ST} (Wright, 1950) y G_{ST} (Nei, 1973). El R_{ST} está basado en el SMM, lo que posibilita la estimación de las relaciones entre individuos así como su estructuración en ausencia de homoplasia (donde los alelos poseen el mismo estado pero no es causado por descendencia).

Su fórmula se expresa como:

$$R_{ST} = \frac{(S - S_W)}{S}$$

Donde S : Promedio al cuadrado de la diferencia en el tamaño del alelo entre todos los pares de alelos

S_W : Promedio de la suma de cuadrados de las diferencias en el tamaño del alelo dentro de cada subpoblación

Estas dos cantidades, y por lo tanto el R_{ST} , se calculan a partir de las variaciones de los tamaños de los alelos, mientras que F_{ST} se deriva de las variaciones de las frecuencias alélicas (Michalakis y Excoffier, 1996; Rousset, 1996).

2.4.4. Determinación de grupos genéticos

Debido a la naturaleza multidimensional de la información, se requieren métodos que permitan que en distintas unidades de muestreo se permitan los cálculos en simultáneo de varias variables. Un método multivariado tiene como objetivo encontrar proximidades

entre individuos caracterizados por múltiples variables al resumir la información en pocas variables sintéticas (Johnson y Wichern, 1998).

Los métodos de *Clustering* o de clasificación tienen como propósito la agrupación de unidades de muestreo con base en sus propias características, de modo tal que los individuos que sean similares en expresión se concentrarán, bajo un método matemático, en un mismo *cluster* o grupo. Los grupos de individuos resultantes deberán exhibir una alta homogeneidad interna (dentro del grupo) y una alta heterogeneidad externa (entre grupos). Por lo tanto, si la clasificación es exitosa, los individuos dentro de un grupo deben estar más cerca cuando se representan geoméricamente y los grupos diferentes deben estar más separados (Hair et al., 2014). Estos métodos se dividen en dos clases:

- a) Métodos que utilizan una matriz de distancia por pares para el análisis mediante un algoritmo de agrupamiento que da como resultado una representación gráfica (árbol o dendograma).
- b) Métodos que utilizan modelos paramétricos para obtener distintas observaciones de cada grupo, donde las inferencias sobre los parámetros de distribución (la membresía de cada individuo a un grupo específico) se estiman utilizando estadísticos estándares, como pueden ser el método bayesiano o la máxima verosimilitud.

Por otro lado, los modelos por ordenación consisten en reducir un conjunto de datos genéticos que conste de muchos loci e individuos a unas pocas variables no correlacionadas. Los métodos de ordenación son exploratorios porque resumen los datos sin depender de modelos genéticos como Hardy-Weinberg (Jombart et al., 2009). Estos métodos construyen ejes principales a partir de los datos, sobre los cuales se maximiza la dispersión o inercia. Los *eigenvalues* representan la varianza de cada eje principal. La relación de los puntos de datos con estos ejes principales se define por sus componentes principales (Lee et al., 2009).

El análisis de componentes principales (PCA) resume la varianza en los datos al tiempo que retiene la información de la distancia entre los alelos, es el método de ordenación más simple aplicado a la genética de poblaciones. En contraste, el análisis de coordenadas principales (PCoA) no representa alelos, sino que descompone una medida de distancia o diferenciación previamente calculada. La PCoA depende de los supuestos del modelo empleado para calcular la distancia o la diferenciación, y está sujeta a los matices del estadístico y estimador elegidos (Jombart et al., 2009).

Se pueden realizar diferentes métodos de ordenación en pasos sucesivos para superar las limitaciones de cada uno. En el análisis discriminante de los componentes principales (DAPC) (Jombart et al., 2010), el PCA se realiza para resumir la diversidad entre los individuos. Una vez que los individuos se asignan a los grupos utilizando algoritmo de agrupamiento de k-medias y el número de grupos es determinado mediante un criterio de información, se realiza un análisis discriminante (DA) en los datos descompuestos para evaluar la diferenciación entre grupos al dividir la diversidad en componentes. En contraste con otros métodos multivariados, maximiza la separación entre grupos al tiempo que minimiza la variación dentro de un grupo, proporcionando una mejor discriminación de los grupos predefinidos (Bolton et al., 2016).

3. HIPÓTESIS

Hipótesis nula

No existe diversidad genética ni estructura genética de patos criollos en los departamentos de Piura y Amazonas.

Hipótesis alternativa

Existe diversidad genética y estructura genética poblacional de patos criollos en los departamentos de Piura y Amazonas.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la variabilidad genética del pato criollo (*Cairina moschata*) en poblaciones domesticas ubicadas en los departamentos de Piura y Amazonas utilizando marcadores microsatélites.

Objetivos Específicos

- Evaluar mediante el sistema de PCR múltiplex, marcadores microsatélites en patos criollos de los departamentos de Piura y Amazonas.
- Determinar la diversidad genética intra e inter poblacional de patos criollos de los departamentos de Piura y Amazonas.
- Determinar la estructura genética de las poblaciones de patos criollos de los departamentos de Piura y Amazonas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de estudio

El material biológico fue recolectado en el año 2017 durante los meses de marzo y julio, estuvo conformado por un total de 155 individuos de la especie *C. moschata* procedentes de distintos centros poblados localizados en los departamentos de Piura y Amazonas. En el departamento de Piura fueron colectados 81 individuos provenientes de las provincias de Morropón y Piura; mientras que el departamento de Amazonas, 74 individuos fueron colectados en las provincias de Bagua, Condorcanqui, Chachapoyas y Rodríguez de Mendoza (Figura 4, Tabla 3).

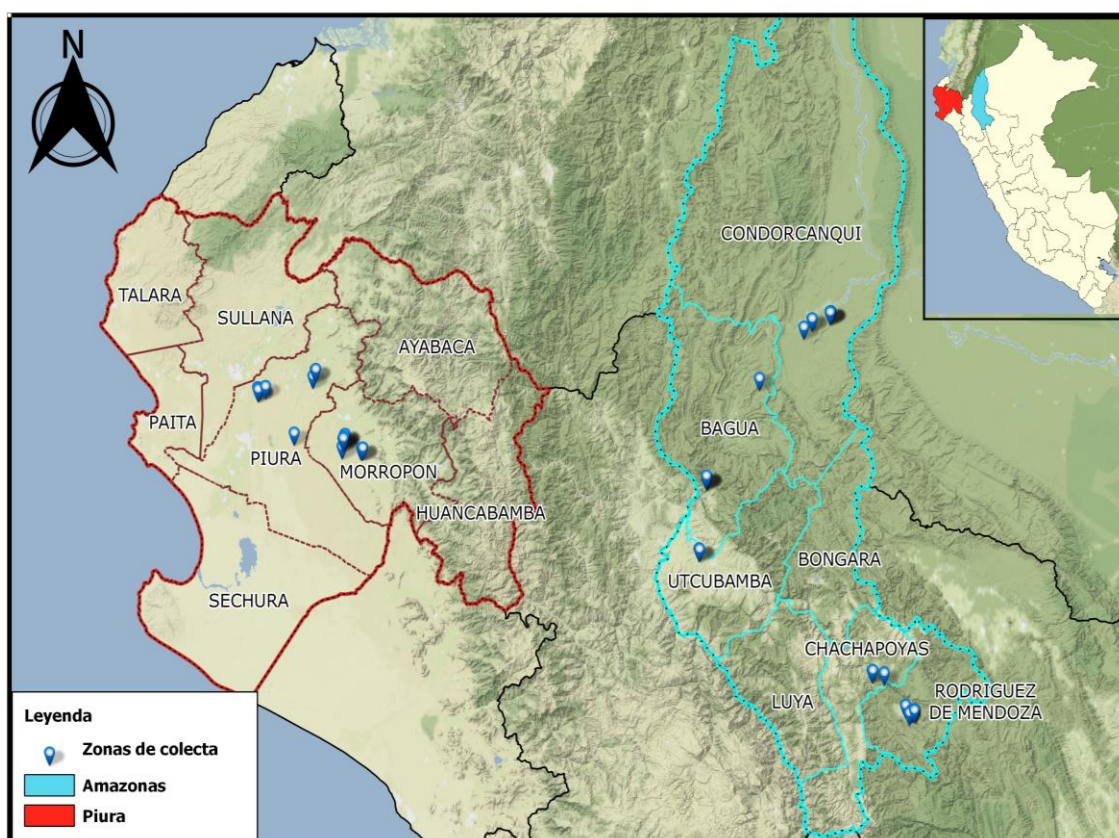


Figura 4. Ubicación geográfica de las zonas de muestreo en los departamentos de Piura y Amazonas. Mapa generado por QGIS v2.18.

Tabla 3. Ubicación (por provincias) y cantidad de individuos muestreados en los departamentos de Piura y Amazonas

Departamento	Provincia	N° de individuos
Piura	Morropón	46
	Piura	35
Amazonas	Bagua	25
	Condorcanqui	18
	Chachapoyas	10
	Rodríguez de Mendoza	21

5.2. Colecta de muestras

En un principio se ubicaron puntos de muestreo por cada centro poblado, los dueños de los animales fueron informados acerca de la actividad realizada. Para el control del animal durante la extracción se necesitó de una persona para sujetar al animal mientras que otra se encargó de la remoción de las plumas. Por cada individuo se extrajo de cinco a siete plumas por ala, en concreto aquellas que se encuentran en la zona cobertora secundaria. Las muestras extraídas fueron depositadas en bolsas *ziploc* debidamente etiquetadas con los números de accesoión. La información proporcionada por los dueños de los patos fue recopilada en una encuesta (sexo, color, edad en meses), así como las coordenadas de la zona de colecta, el código de la foto registrada por animal y observaciones en caso fuera necesario (Anexo 1). Todo el material biológico se mantuvo a una temperatura menor de 20°C y alejado de la luz solar con el fin de evitar su degradación, hasta la llegada al laboratorio de Biología Molecular y Genómica en la sede central del INIA en Lima, donde fueron refrigeradas a 4°C hasta su uso en la extracción de ADN (Figura 5).



Figura 5. Procedimiento de colecta de muestras biológicas. A) Corral para crianza en Piura. B) Corral para crianza en Amazonas. C) Extracción de plumas cobertoras alares. D) Registro fotográfico del animal de origen y almacenamiento de la muestra en bolsas *ziploc*.

5.3. Extracción de ADN genómico

Se hizo uso del cálamó de las plumas que se encontraban insertadas en la piel del ave con el objetivo de obtener el ADN genómico. El protocolo de extracción se basó en los empleados por Kocher et al. (1989), Vigilant et al. (1989) y Thomas et al. (1989) que coinciden en la purificación del ADN con Fenol-Cloroformo, con leves modificaciones utilizadas por Taberlet y Bouvet (1991) y Bello et al. (2001) que tienen en consideración a la pluma como material biológico (Anexo 2):

- Se realizó el corte del cálamó de forma transversal y en porciones de hasta 2 cm, los cuales fueron colocados en tubos de microcentrífuga de 2 mL. (Figura 6).
- A cada tubo se agregó 750 μL de buffer Tris EDTA 20:5 (pH 8), 75 μL de SDS 10% y 15 μL de Proteinasa K (20 mg/ μL), para llevarlo a un volumen final de 840 μL .

- Los tubos fueron incubados a 58°C por 3 horas en constante agitación.
- Se agregaron 500 µL de acetato de potasio 3M para separar las impurezas.
- Se realizaron dos lavados con un solución de cloroformo : alcohol isoamílico en proporción 24:1 con el fin de separar eficientemente la fase acuosa de la orgánica.
- Con una solución de isopropanol y etanol absoluto se precipitó el ADN.
- Luego, se resuspendió en Tris EDTA 20:5 en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Para precipitar impurezas en el ADN, se realizó un lavado con cloruro de sodio 5M.
- Se realizaron lavados finales con etanol absoluto para precipitar el ADN.
- Obtenido el precipitado de ADN, se resuspendió en TE 10:1 (Tris EDTA 10:1, pH 8) y, de acuerdo al tamaño de este, se asignaron volúmenes entre 50 a 300 µL.
- Los tubos se almacenaron a -20°C para su conservación.

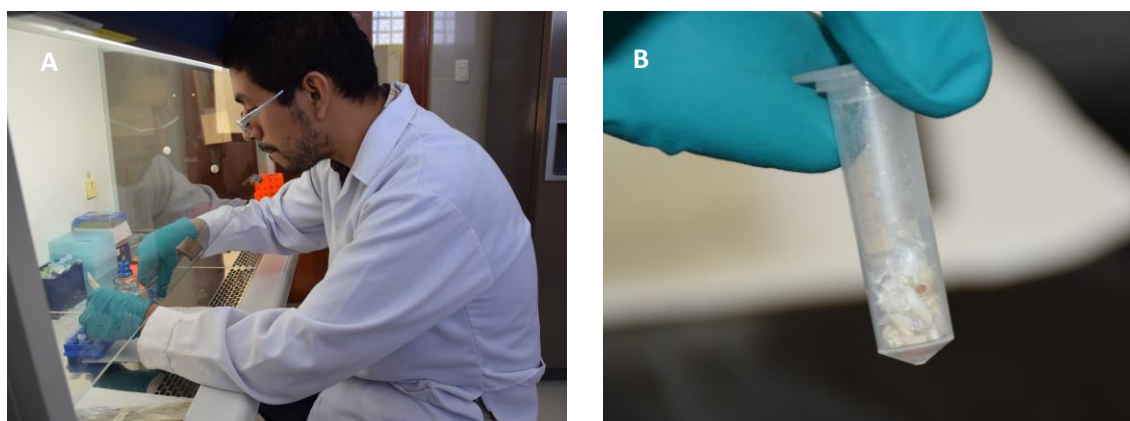


Figura 6. Método de extracción a partir del cálamo de la pluma. A) Corte de cálamo. B) Cálamo cortado transversalmente y colocado en un tubo de microcentrífuga.

5.4. Verificación de calidad y cantidad de ADN

La calidad del ADN se verificó mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Se colocaron 2 µL de la solución stock de ADN (tubos de microcentrífuga con ADN resuspendido procedente de la extracción) y se adicionó 6 µL de buffer de carga SalB 2X (que contiene el agente intercalante del ADN GelRed 2X) para la electroforesis a un voltaje constante de 120 V durante 15 minutos empleando un buffer de corrida TBE 1X (Tris-HCl, ácido bórico, EDTA; pH 8). Para registrar las bandas se utilizó un

transiluminador UV ChemiDoc XRS+, y para el procesamiento de las imágenes se empleó el software Quantity One v. 4.6.3 (Anexo 3).

El ADN fue cuantificado con la ayuda del espectrofotómetro Epoch (Biotek, Winooski, VT, USA). Para verificar la pureza del ADN, se consideró una razón de absorbancia 260/280 mayor a 1.8. Luego de comprobar la pureza de las soluciones stock, se llevó a cabo la preparación de diluciones de trabajo de ADN a una concentración de 30 ng/μL aproximadamente utilizando TE 10:1, estas se almacenaron a -20°C hasta su uso. La calidad de las diluciones se comprobó a través de electroforesis en gel de agarosa al 2% (4 μL dilución y 6 μL buffer de carga SalB 2X, 120 V por 20 minutos) (Anexo 4). Finalmente, las soluciones stock de ADN se guardaron en ultracongeladoras a -70°C.

5.5. Selección de los microsatélites

Se eligieron 25 cebadores microsatélites utilizados en estudios de variabilidad genética en la especie *A. platyrhynchos*, los cuales poseen un alto contenido polimórfico con la especie objetivo, y han sido evaluados con éxito en poblaciones de *C. moschata* pertenecientes a regiones del sudeste de Asia (Maak et al., 2003; Huang et al., 2005; Ahmadi et al., 2007) Así también, se seleccionaron 4 cebadores SSRs utilizados por Stai y Hughes (2003), los cuales fueron diseñados para *C. moschata* y que resultaron ser polimórficos en una población silvestre (Anexo 5).

5.6. Amplificación de los microsatélites

A la construcción de los 29 cebadores *forward* se le agregó una secuencia adicional de 19 pb la cual es complementaria a la cola M13, y a su vez el cebador universal M13 fue marcado con 4 diferentes fluoróforos que fueron detectados en el secuenciador automático. Las reacciones de amplificación por PCR múltiplex se llevaron a cabo usando aquellos 23 marcadores SSR que resultaron tener una transferibilidad exitosa, mientras que los 6 marcadores restantes fueron excluidos debido a que no presentaron amplificados para la especie objetivo (Tabla 4).

Tabla 4. Selección de los 23 cebadores utilizados para la amplificación de SSR en patos criollos.

Locus	Secuencias 5'-3' Forward (F) y Reverse (R)	Fluoróforo	Referencia
APH07	F: *ACATCTTTGGCATTGAA R: CATCCACTAGAACACAGACATT	PET	Maak et al., 2000; Baratti et al., 2009; Ahmadi et al., 2007.
APH13	F: *CAACGAGTGACAATGATAAA R: CAATGATCTCACTCCCAATAG	VIC	Maak et al., 2003.
APH18	F: *TTCTGGCCTGATAGGTATGAG R: GAATTGGGTGGTTCATACTGT	VIC	Maak et al., 2003.
APL2	F: *GATTCAACCTTAGCTATCAGTCTCC R: CGCTCTTGGCAAATGTCC	6-FAM	Denk et al., 2004.
APL11	F: *AACTACAGGGCACCTTATTTCC R: TTGCATCAGGGTCTGTATTTTC	NED	Denk et al., 2004.
APL36	F: *ATGCTTTGCTGTTGGAGAGC R: TCCACTGGGTGCAAACAAG	NED	Denk et al., 2004.
APL580	F: *GGATGTTGCCCCACATATTT R: TTGCCTTGTTTATGA GCCATTA	6-FAM	Zhao et al., 2005; Su et al., 2007.
APT004	F: *GGGCAGGAAAATCTCCTGAAT R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC	NED	Hsiao et al., 2008.
APT021	F: *GCACTCCCTAACTAGTAGCGCTCT R: GAAGCATTGTCATACTTGCCCTGA	PET	Hsiao et al., 2008.
APT025	F: *TCCTAAGAAACGTTGCTTCATAGACC R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG	VIC	Hsiao et al., 2008.
APT029	F: *TCTGCAAGGTATTCTCATTCTTATTCTT R: GATACGTAGAGTGGATGCTGGAGAT	PET	Hsiao et al., 2008.
AY285	F: *TCCCACCCCAAACCTGC R: TGTGTAACCCGATAGACTGA	NED	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
AY294	F: *TG TAGTTTAGTTGCTGGATA R: TTAGTAAACTCTTGCCATCT	PET	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
AY295	F: *GGCTTCTGTGCTCCTCAGAT R: GCACAAGTGGCATGTGTCAT	6-FAM	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
CADU24	F: *CCAGCCAAGAACCTCCAGT R: CTTTGAATGTCCATGTAGCAG	PET	Su et al., 2007.
CADU86	F: *GCAGAGCGGTGTGAGAGCA R: AACACAGCTTCACCCACAG	6-FAM	Su et al., 2007.
CAUD001	F: *ACAGCTTCAGCAGACTTAGA R: GCAGAAAGTGATTAAGGAAG	NED	Huang et al., 2005.

Tabla 4. Selección de los 23 cebadores utilizados para la amplificación de SSR en patos criollos (continuación).

Locus	Secuencias 5'-3' Forward (F) y Reverse (R)	Fluoróforo	Referencia
CAUD022	F: *CATGCTGAGTGTCTATCCT R: CCAGGTCAGGCGTGTGCT	NED	Huang et al., 2005.
CAUD026	F: *ACGTCACATCACCCACAG R: CTTTGCCTCTGGTGAGGTTC	6-FAM	Huang et al., 2005.
CmAAT16	F: *CTCCCAAGGGTACCAGTGAA R: TGTGGCTCCCTGCTTAAA	6-FAM	Stai y Hughes, 2003.
CmAAT35	F: *TCCAGGTCACGTAGTTTTTAAGTA R: GACCTAAGGCCAACCTATATC	6-FAM	Stai y Hughes, 2003.
CmAAT38	F: *TCCCGAGCTACCACATTGAC R: AGCAACTGGAAGGCATTTATC	NED	Stai y Hughes, 2003.
CMO211	F: *GGATGTTGCCCCACATATTT R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATT	VIC	Zhao et al., 2005; Su et al., 2007.

* = cola M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC).

Las reacciones se realizaron en placas de PCR de 96 pocillos, se adecuaron a un volumen final de 10 μ L y consistieron de 60 ng de ADN, 1X de solución buffer de PCR, 0.2 a 0.3 mM de dNTPs, 2 a 3 mM de $MgCl_2$, 0.2 a 0.3 del cebador universal M13 unido a uno de los 4 fluoróforos, 0.025 – 0.8 μ M de cada cebador *forward* y *reverse*, y 0.5 U de Taq Polimerasa (Mullis, 1990) (Anexo 6).

Las amplificaciones siguieron tres programas diferentes (Anexo 7):

- Para los protocolos FAM-1 y FAM-2: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95°C por 45 segundos; temperaturas de hibridación específica para un set de cebadores a 57°C (FAM-1) y 59°C (FAM-2) por 1 minuto; extensión a 72°C por 1 minuto; y extensión final a 72°C por 10 minutos.
- Para los protocolos NED-1, NED-2 y PET-1: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 45 segundos; temperaturas de hibridación específica para un set de cebadores a 53°C (NED-1 y NED-2) y 57°C (PET-1) por 1 minuto; extensión a 72°C por 1 minuto; y extensión final a 72°C por 10 minutos.

- Para los protocolos VIC y PET-2: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de 95°C por 45 segundos; temperaturas de hibridación determinada para un conjunto de cebadores por 1 minuto a 57°C y una extensión a 72°C por 1 minuto; adicionalmente 10 ciclos de 95°C por 45 segundos; una temperatura de hibridación para el cebador M13 a 53°C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto; finalmente una extensión final a 72°C por 10 minutos (Schuelke, 2000; Hayden et al., 2008; Oblessuc et al., 2009).

Los productos fueron separados en un secuenciador automático ABI 3130XL de Applied Biosystems (Foster, CA, USA) por medio de electroforesis capilar empleando el gel polímero POP-7. Los volúmenes del producto amplificado estuvieron en un intervalo de 0.4 a 1.2 µL, los cuales fueron mezclados en un mix de formamida Hi-Di y el marcador alélico 600 LIZ™ en proporción 9.7:0.3. Luego de realizada la mezcla y como paso previo a la corrida en el analizador genético, las muestras fueron sometidas a una incubación de 94°C por 3 minutos para desnaturalización, seguido de la inducción a choque térmico al incubar las muestras a -20°C por 3 minutos.

5.7. Análisis de datos

Los resultados de los electroferogramas fueron visualizados y editados con el software GeneMapper v. 4.1, a fin de asignar a cada pico (medido en URF) su respectivo tamaño en pares de bases (pb), los cuales representan a los alelos. El programa fue configurado con un límite de detección de 100 URF para que todo pico con menor valor sea considerado como ruido. Asimismo, el programa asignó de forma automática a todo pico mayor a 100 URF como alelo, por lo que se examinó a todos los electroferogramas para comprobar si los alelos fueron asignados correctamente o si se encontraban picos no clasificados como alelos, de este modo se realizaron las debidas correcciones manualmente. Al terminar las correcciones, se exportó la matriz de datos a una hoja de cálculo que sirvió para comenzar a utilizar las herramientas bioinformáticas.

5.8. Análisis estadístico

La matriz de alelos de la hoja de cálculo se exportó a distintos formatos con el software PGDSpider v 2.1.1.5 (Lischer y Excoffier, 2012) para los correspondientes análisis estadísticos, los cuales consistieron en el cálculo de la variabilidad genética así como la determinación de la estructura genética.

5.8.1. Análisis de la variabilidad genética

Mediante el manejo de la matriz de genotipos, se utilizó el software Cervus v 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) para conseguir el número de alelos, las frecuencias alélicas por locus, el contenido de información polimórfica (PIC) de cada locus y la heterocigosidad (H_o y H_e) tanto por locus como el promedio. En el caso del número efectivo de alelos, se recurrió al cálculo mediante la fórmula de Frankham et al. (2002). Para detectar la presencia de alelos nulos se empleó el programa MicroChecker, el cual dispone de cuatro algoritmos para identificarlos a partir de las frecuencias alélicas (Van Oosterhout et al., 2004).

Las evaluaciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y desequilibrio de ligamiento (DL) se realizaron empleando el programa GENEPOP v. 4.1 (Rousset, 2008) y fueron corroboradas con el programa GenAIEx6 (Peakall y Smouse, 2012). En el caso del EHW, se ejecutó la prueba exacta de Fisher mediante el método de cadena de Markov Monte Carlo (Guo y Thompson, 1992) con 10 000 demorizaciones y 5 000 iteraciones por lote para evaluar el déficit y el exceso de heterocigotos. En el caso del DL, se empleó el estadístico G para evaluar las desviaciones de desequilibrio y así probar la hipótesis de independencia de genotipos entre los loci. Mediante la corrección de Bonferroni, se extendió el intervalo de confianza para ambas pruebas de $p > 0.05$ a $p > 0.0026$ para la prueba de EHW y a $p > 0.00029$ para la prueba de DL.

5.1.1. Análisis de la estructura genética poblacional.

Se realizó una prueba de AMOVA con el programa GenAlEx6 (Meirmans, 2012) por medio de las distancias genéticas, asimismo se calcularon los estadísticos F y R indicando en ambos casos la asignación del tamaño regional (departamentos) y poblacional (provincias), del mismo modo se calculó la diferenciación genética entre provincias en una matriz pareada. Como parte de la configuración de estas pruebas, se determinó un total de 9999 permutaciones, cifra indicada para muestras grandes.

Se realizó un método de agrupamiento basado en un modelo bayesiano mediante el uso de ParallelStructure v2.3.4 (Besnier y Glover, 2013) proporcionada por la plataforma en línea CIPRES Science Gateway v.3.3 (<http://www.phylo.org>) (Miller et al., 2011). Se empleó un set de parámetros, tales como: 10 replicados por cada número de grupos permitidos en el análisis (K), un rango de agrupamiento de K=1 a K=11, 500 000 iteraciones burn-in y 1 000 000 iteraciones totales de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Se realizaron 2 evaluaciones distintas para tener un indicio de una posible diferenciación entre departamentos y entre provincias. Para estimar el valor de K óptimo entre las diferentes evaluaciones, se analizó la probabilidad logarítmica de los datos ($\ln P(K)$) así como los valores ΔK (Evanno et al., 2005) empleando Structure Selector (Li y Liu, 2018). Además, otro parámetro utilizado para escoger el valor de K más adecuado es mediante los valores ΔF_{ST} (Falush et al., 2003) implementado en el paquete Corrsieve (Campana et al., 2011) del programa R (R Development Core Team, 2008) utilizando R Studio v. 1.1.456. De forma similar al ΔK , se prefiere el mayor valor como posibles soluciones óptimas para la diferenciación entre subpoblaciones. La representación gráfica de los resultados se obtuvo utilizando CLUMPAK (Kopelman et al., 2015).

Como un método independiente al modelo de clasificación, se realizó el análisis discriminante de componentes principales (DAPC), incluido en el paquete Adegenet del software R. Bolton et al. (2016) resalta la ventaja que tiene este método de ordenación

debido a que no se basa en ningún otro modelo genético de poblaciones para determinar el número de grupos genéticos. En el caso de las poblaciones domésticas es particularmente relevante, ya que a menudo muestran violaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg debido al apareamiento no aleatorio.

Los datos alélicos fueron transformados en variables no correlacionadas mediante la función *find.clusters* del paquete Adegenet, el cual contrasta los distintos tipos de agrupamiento mediante un algoritmo de k-medias usando el criterio de información bayesiano (BIC). El número óptimo de grupos es representado por el menor valor de BIC. Posteriormente, se utilizó la función *dapc* (del paquete Adegenet) que trabaja con las agrupaciones halladas por *find.clusters*, donde la distancia entre grupos se maximiza. (Jombart y Collins, 2016).

El DAPC obedece a la conversión de los datos utilizando los componentes principales (PC) como punto de partida para el análisis discriminante, por lo que es necesario un procedimiento de optimización para identificar el punto intermedio de retención de PC. En ese sentido, se realizó una validación cruzada como un procedimiento de optimización en el cual los datos se dividen en dos conjuntos: un conjunto de entrenamiento (que generalmente comprende el 90% de los datos) y uno de validación que contiene el resto de los datos. Con la función *xvalDapc* (del paquete Adegenet), el conjunto de validación se selecciona mediante un muestreo aleatorio estratificado: esto garantiza que al menos un miembro de cada grupo en los datos originales se represente en los conjuntos de entrenamiento y validación. El DAPC se lleva a cabo en el conjunto de entrenamiento con un número variable de PC retenidas, y el grado en el que el análisis puede predecir con precisión la pertenencia a grupos de individuos excluidos (aquellos en el conjunto de validación) se utiliza para identificar el número óptimo de PC para retener (Jombart y Collins, 2016). En cada nivel de retención de PC, los procedimientos de muestreo y DAPC se repitieron 500 veces.

6. RESULTADOS

6.1. Extracción de ADN

Mediante el protocolo de extracción a partir del cálamo de plumas cobertoras alares se obtuvo ADN genómico de buena concentración (20 - 300 ng/μL), y calidad. Se obtuvo una mayor concentración y calidad de ADN partir de las plumas que presentaban restos de sangre en la vaina protectora del cálamo, por la presencia de eritrocitos nucleados (Khatib y Gruenbaum, 1996).

6.2. Amplificación de SSR y determinación de los productos amplificados

Los productos amplificados se identificaron en primer lugar a través de las bandas obtenidas en la electroforesis en gel de agarosa a 2%, y posteriormente con la técnica de electroforesis capilar, los productos fueron verificados mediante electroferogramas con el software GeneMapper (Figura 7). Los marcadores microsatélites trinucleótidos CmAAT16, CmAAT35 y CmAAT38 presentaron menor cantidad de picos tartamudos que los marcadores dinucleótidos y algunos tetranucleótidos.

6.3. Parámetros indicativos de variabilidad genética

6.3.1. Número de alelos

En 155 individuos de *C. moschata*, el número total de alelos (A) expresados a través de los 23 marcadores microsatélites (Figura 7) fue de 201 con una media de 8.74 por locus. El mayor número de alelos (A=34) se encontró en el locus AY295; mientras el menor número (A=1) para los loci APH18 y APL36. Entre las dos regiones bajo estudio, el departamento de Amazonas reveló una diversidad alélica mayor, con una media de 7.65 alelos, mientras que en el departamento de Piura se mostró una media de 6.74. Ambas poblaciones comparten 130 alelos, mientras que los alelos privados fueron 25 en la población de Piura y 46 en Amazonas (Tabla 5).

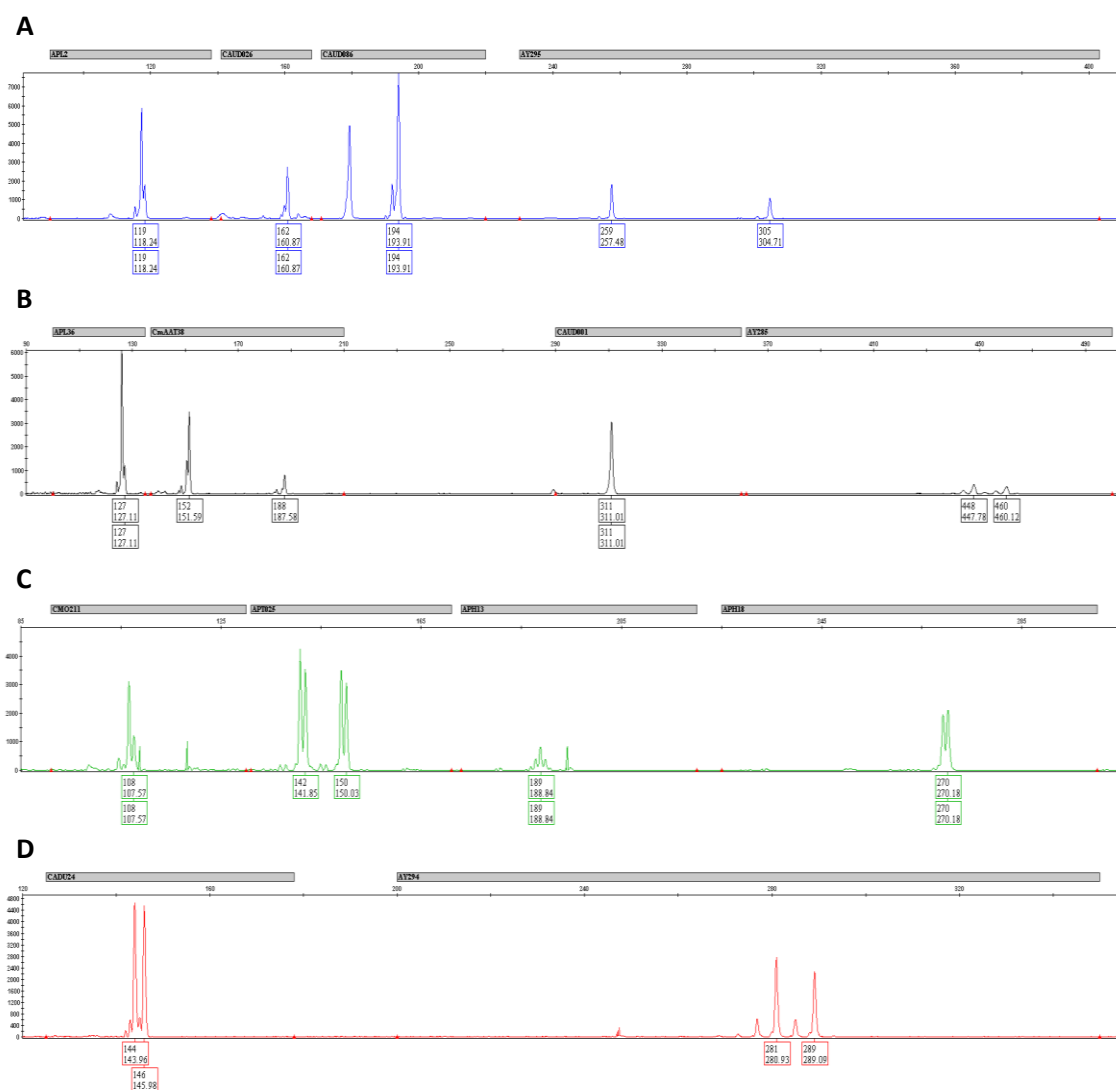


Figura 7. Electroferogramas registrados por el programa GeneMapper a partir de los amplificadores de los marcadores microsatélites. A) 6-FAM. B) NED. C) VIC y D) PET.

Tabla 5. Número total de alelos de las poblaciones de Piura y Amazonas.

Loci identificados	Población		A	Ae
	Piura	Amazonas		
APH07	5	6	6	2.83
APH13	4	4	4	3.08
APH18	1	1	1	1
APL2	2	1	2	1.01
APL11	1	2	2	1.01
APL36	1	1	1	1
APL580	11	9	12	2.6
APT004	4	5	5	1.75
APT021	5	6	6	3.36
APT025	5	7	7	3.94
APT029	8	8	8	4.1
AY285	17	20	24	10.99
AY294	21	24	28	12.35
AY295	24	27	34	10.53
CADU24	4	4	5	1.52
CADU86	4	3	4	1.46
CAUD001	2	3	3	1.73
CAUD022	6	5	6	2.55
CAUD026	4	4	5	1.32
CmAAT16	8	8	8	3.21
CmAAT35	6	9	9	2.03
CmAAT38	8	13	15	5.21
CMO211	4	6	6	2.38
Total	155	176	201	80.94
Promedio	6.74	7.65	8.74	3.52
D.E.	6.14	7.06	8.68	3.28
Alelos privados	25	46		

A=
Número

de alelos

Ae = Número efectivo de alelos

D.E. = Desviación estándar

6.3.2. Frecuencias alélicas y alelos raros

A partir de los registros de las frecuencias alélicas (Anexo 8), se evidenció que los loci APH18 y APL36 mostraron un solo alelo de 270 pb y 127 pb respectivamente, por lo que sus frecuencias fueron iguales en ambas poblaciones (100%).

a) APH07

Los alelos 236 y 268 presentaron una frecuencia mayor a 20%; siendo el 236 el más frecuente en ambas poblaciones (45.6%, 56.5%) y el 256 fue el menos frecuente (3.8%, 0.7%). El alelo 244 no fue encontrado en la población de Piura (Figura 8).

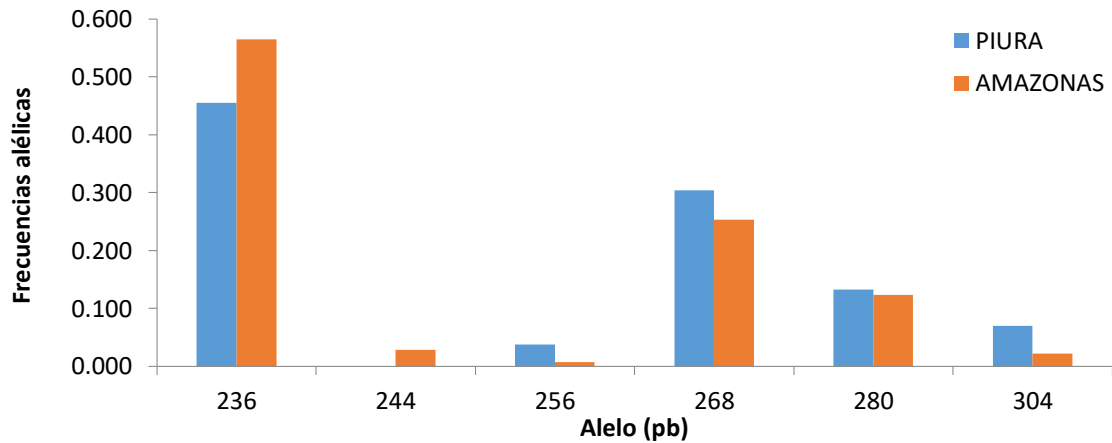


Figura 8. Frecuencias alélicas del marcador APH07.

b) APH13

Los alelos con mayor frecuencia (>25%) fueron 185 y 189; y el menos frecuente el alelo 191 (4.3%, 10.8%). En la población de Piura, el alelo con mayor frecuencia fue 185 (42%); mientras que en la de Amazonas, 189 (47.3%). No se registraron alelos privados (Figura 9).

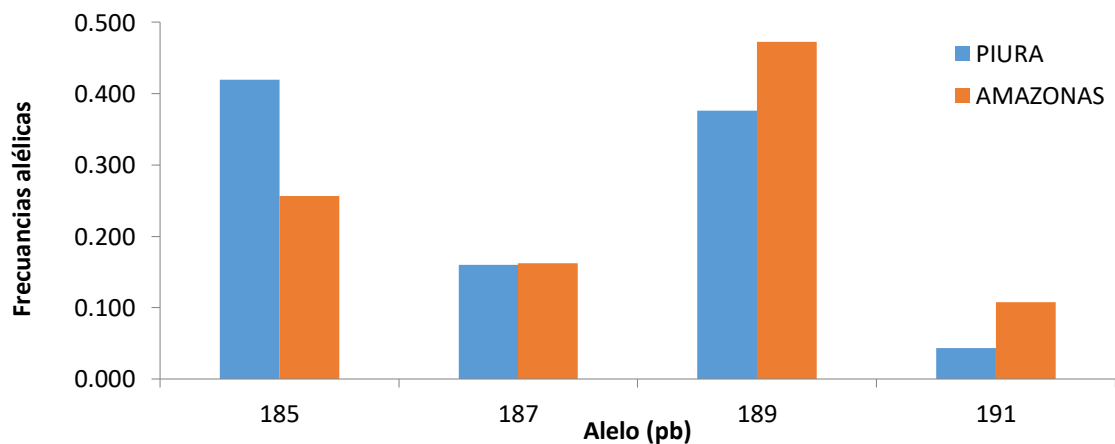


Figura 9. Frecuencias alélicas del marcador APH13.

c) APL2

La población de Piura presentó el alelo de alta frecuencia 119 (98.8%) y el 117 de baja frecuencia (1.2%), mientras que la población de Amazonas solo presentó el alelo 119 (Figura 10).

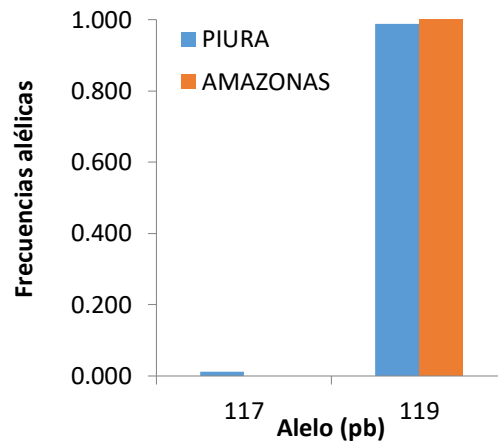


Figura 10. Frecuencias alélicas del marcador APL2.

d) APL11

El alelo 110 presento la mayor frecuencia en la población de Amazonas (98.6%) y el único registrado para la población de Piura. El alelo privado para la población de Amazonas fue el 100 (1.4%) (Figura 11).

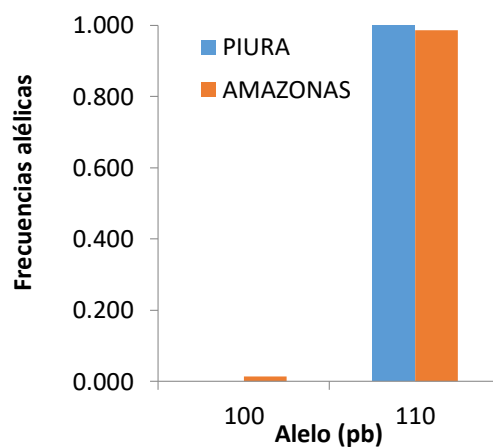


Figura 11. Frecuencias alélicas del marcador APL11.

e) APL580

En ambas poblaciones, el alelo más frecuente fue el 144 (68.5%, 48%); los de menor frecuencia en la población de Piura fueron 122, 138 y 154 (0.6%), los alelos 138 y 154 fueron exclusivos para esta población. En la población de Amazonas, su alelo privado 132 presento menor frecuencia (0.7%). Asimismo, se presentó una diferencia en la frecuencia del alelo 106 entre Amazonas (30.4%) y Piura (6.8%) (Figura 12).

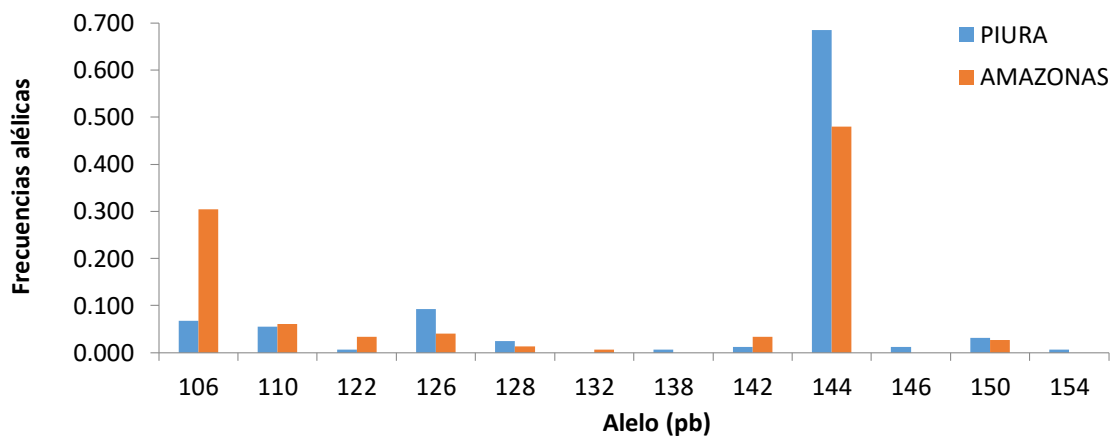


Figura 12. Frecuencias alélicas del marcador APL580.

f) APT004

En ambas poblaciones, el alelo 307 fue el más frecuente (78.9%, 65.9%); el alelo menos frecuente en la población de Piura fue el 303 (1.4%), y en la población de Amazonas fue el alelo 311 (2.2%). Además se observó que el alelo 319 no estuvo presente en la población de Piura (Figura 13).

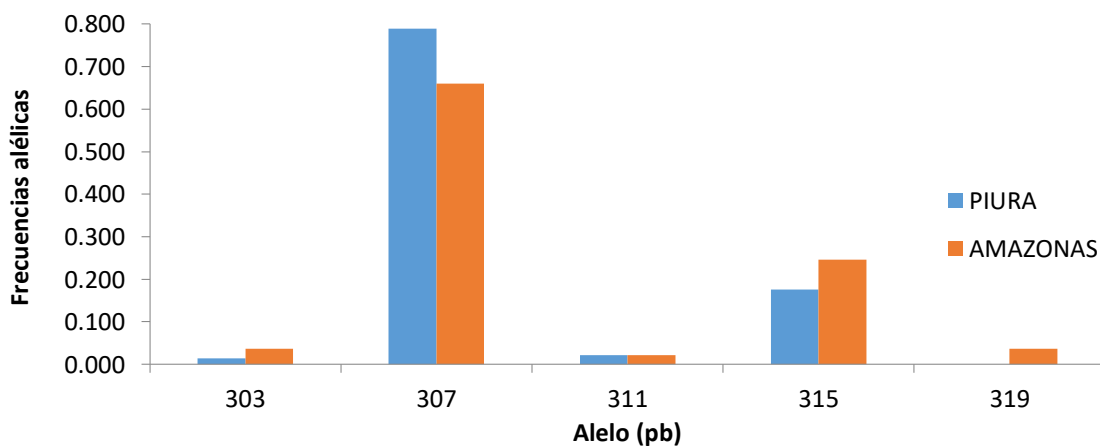


Figura 13. Frecuencias alélicas del marcador APT004.

g) APT021

Para ambas poblaciones, el alelo más común fue el 181 (47.1%, 45.7%), mientras que el menos frecuente fue el de 173 (5.1%, 2.6%). Además, la población de Amazonas presentó el alelo privado de 189 con baja frecuencia (0.9%) (Figura 14).

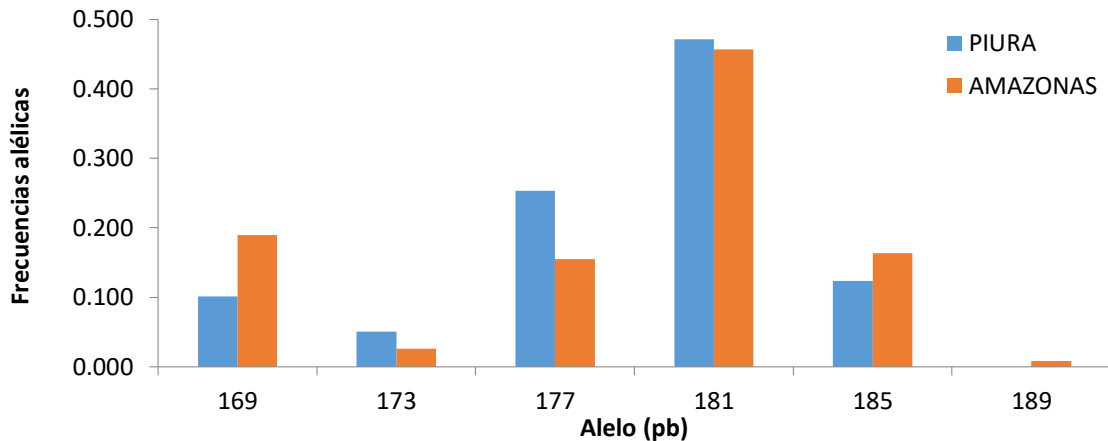


Figura 14. Frecuencias alélicas de marcador APT021.

h) APT025

Los alelos más frecuentes en ambas poblaciones fueron el 142 y 146 (>30%); el alelo menos frecuente en la población de Piura fue el 138 (4.9%), y en la población de Amazonas lo fueron sus alelos privados 134 (3.4%) y 162 (0.7%) (Figura 15).

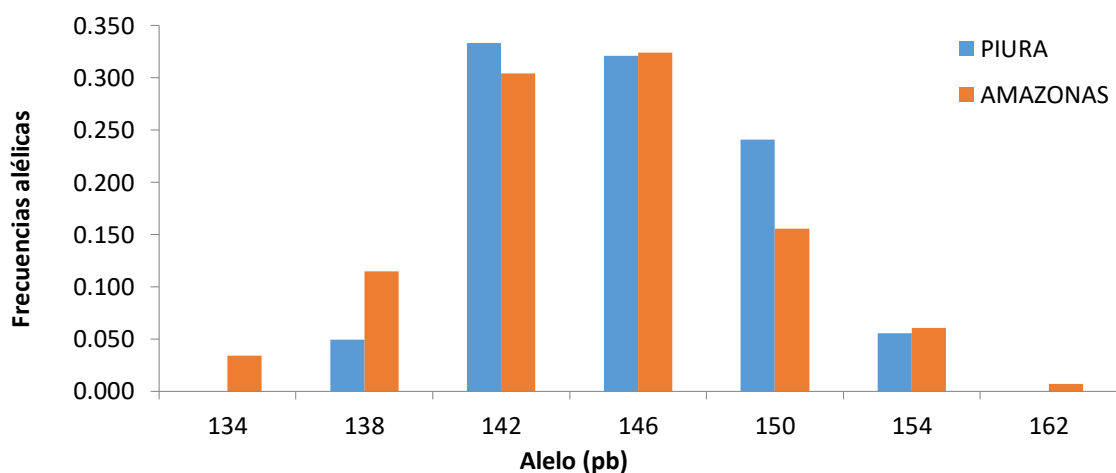


Figura 15. Frecuencias alélicas del marcador APT025.

i) APT029

Ambas poblaciones presentaron a los alelos comunes 187, 191 y 195 como los de mayor frecuencia ($>20\%$); se observó que el alelo 191 posee una frecuencia sobresaliente en la población de Piura (42.4%), mientras en la población de Amazonas los alelos 191 y 195 mostraron frecuencias elevadas (30%). Los alelos con menor frecuencia en ambas poblaciones fueron los alelos 203 y 207 (Figura 16).

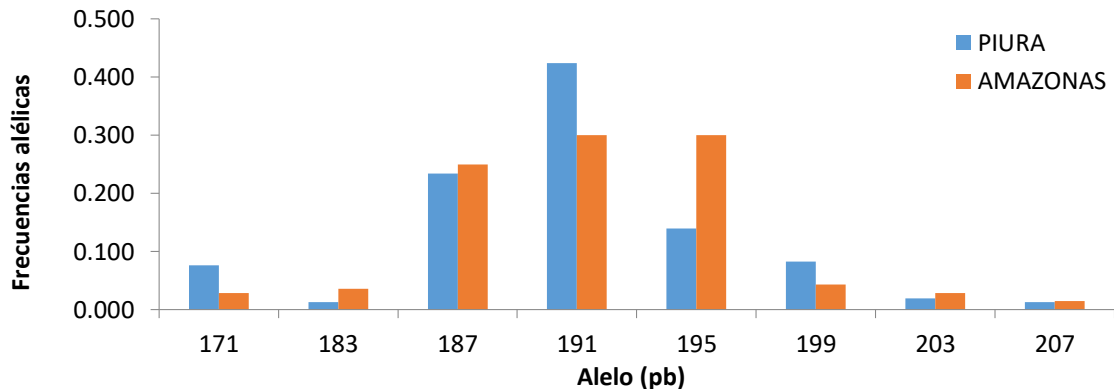


Figura 16. Frecuencias alélicas del marcador APT029.

j) AY285

Se observaron un total de 24 alelos. El alelo más frecuente en ambas poblaciones fue el 452 ($>15\%$) y los menos frecuentes fueron 406 y 468 ($<3\%$). Los alelos 448, 452 y 460 poseen mayor frecuencia para la población de Piura; mientras que en la población de Amazonas, lo presentaron 436 y 464. La población de Piura presentó 4 alelos privados, mientras que la población de Amazonas presentó 7 (Figura 17).

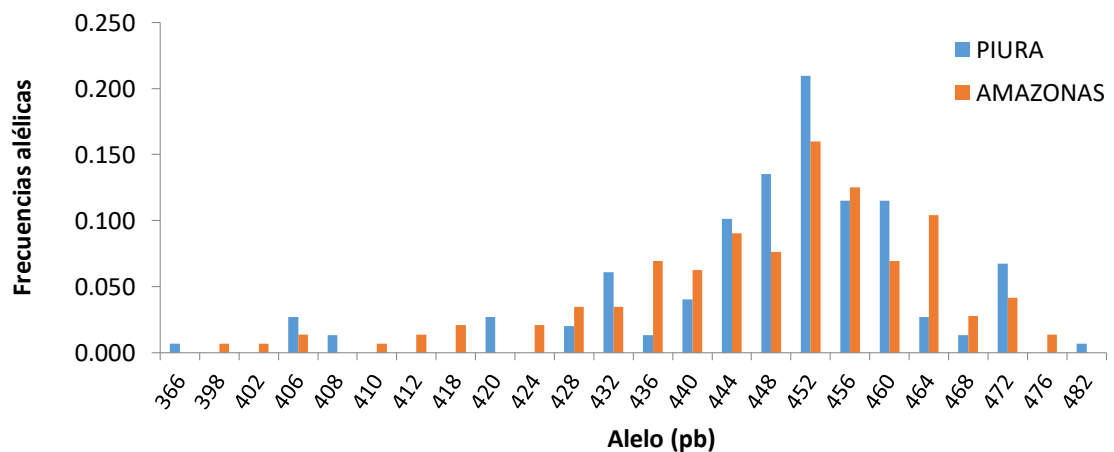


Figura 17. Frecuencias alélicas del marcador AY285.

k) AY294

Entre los 28 alelos encontrados no se evidenciaron frecuencias altas, como en el caso de los alelos 281 y 285 cuyas frecuencias no superaron el 20% en ambas poblaciones. El alelo 289 posee una elevada frecuencia (14.8%) en la población de Piura en contraste a la población de Amazonas (1.4%). Se presentaron 4 alelos privados en la población de Piura y 7 en la población de Amazonas (Figura 18).

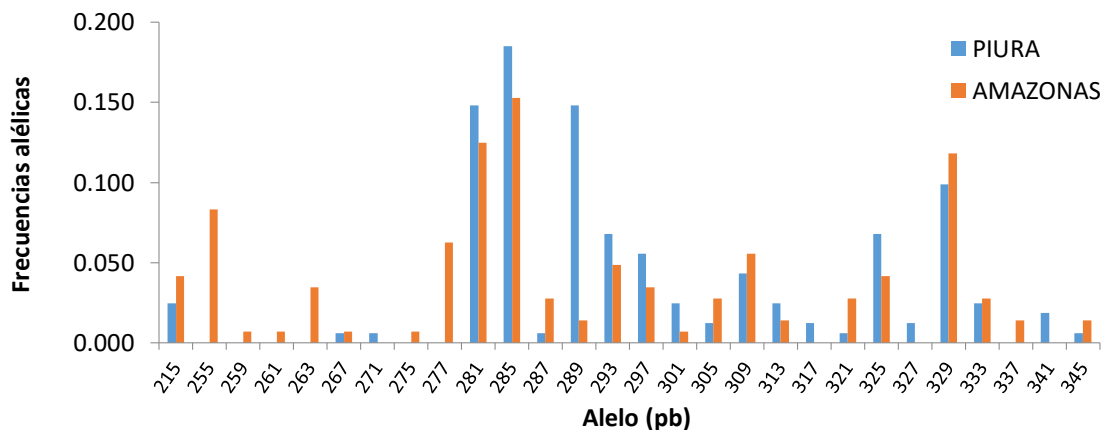


Figura 18. Frecuencias alélicas del marcador AY294.

l) AY295

Posee la mayor cantidad de alelos (34), siendo el alelo 259 el de mayor frecuencia (23.5%, 24%). Las frecuencias del resto de alelos se presentaron en un rango del 0.6 al 18%. La población de Piura presentó 7 alelos privados, mientras que la población de Amazonas presentó 10 (Figura 19).

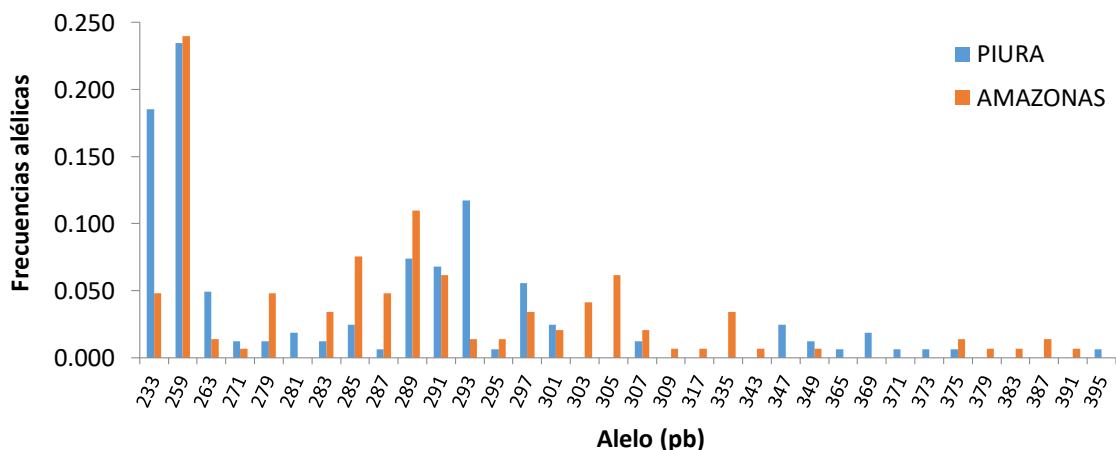


Figura 19. Frecuencias alélicas del marcador AY295.

m) CADU24

Para ambas poblaciones, el alelo con mayor frecuencia fue el 146 (79%, 80.8%), mientras que el resto de alelos presento una menor frecuencia en un rango de 0.6 a 1.4%. El alelo 136 solo se encontró en la población de Piura y el alelo 150 solo en la población de Amazonas (Figura 20).

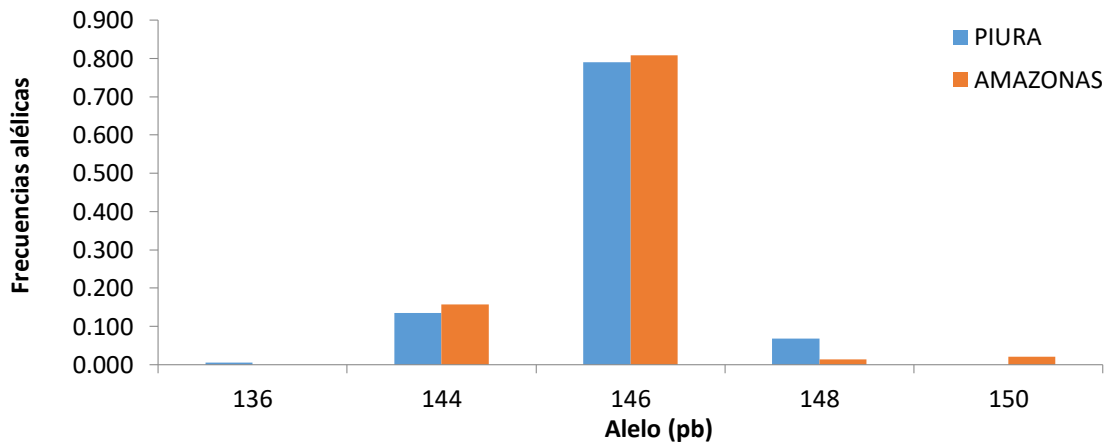


Figura 20. Frecuencias alélicas del marcador CADU24.

n) CADU86

Ambas poblaciones presentaron tres alelos en común, de los cuales el más frecuente fue el 194 (84.9%, 77.6%) y los de menor frecuencia fueron el 184 y 192 (4.8 a 15.3%). La población de Piura presentó el alelo exclusivo 180 de baja frecuencia (0.8%) (Figura 21).

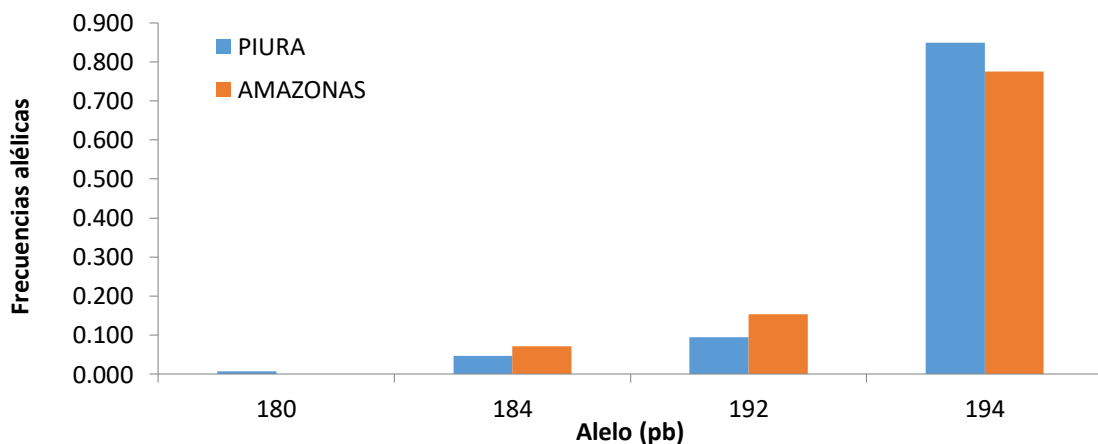


Figura 21. Frecuencias alélicas del marcador CADU86.

o) CAUD001

Presentó 2 alelos en común en ambas poblaciones. El alelo 313 fue el alelo más frecuente (67.1%, 75.4%), seguido del alelo 311 con una frecuencia menor (32.9%, 21.1%). La población de Amazonas presentó el alelo exclusivo 315 de baja frecuencia (3.5%) (Figura 22).

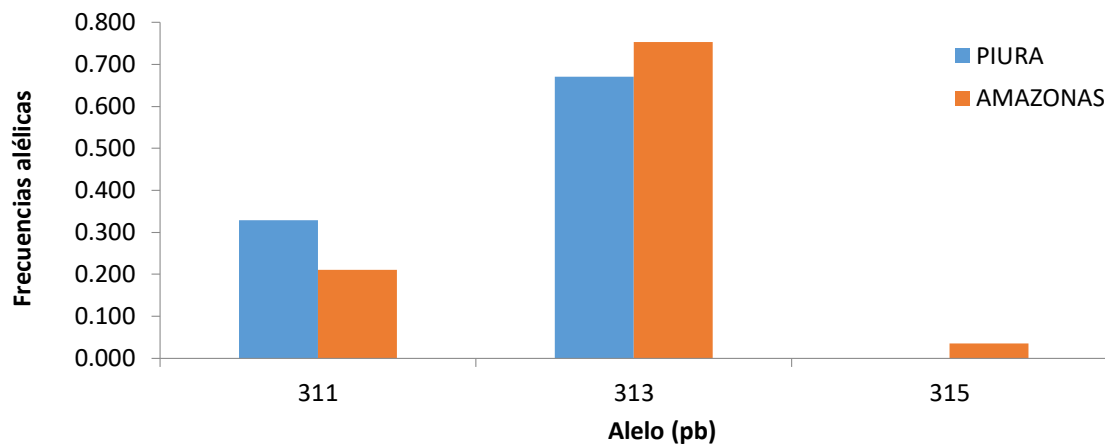


Figura 22. Frecuencias alélicas del marcador CAUD001.

p) CAUD022

El alelo con mayor frecuencia en ambas poblaciones fue el 153 (62.9%, 47.5%). En la población de Amazonas se observó una frecuencia mayor del alelo 150 (31.7%) respecto a la población de Piura (17.9%). Los alelos 156 y 159 presentaron una frecuencia menor del 4%. La población de Piura presentó el alelo privado 141 de baja frecuencia (0.7%) (Figura 23).

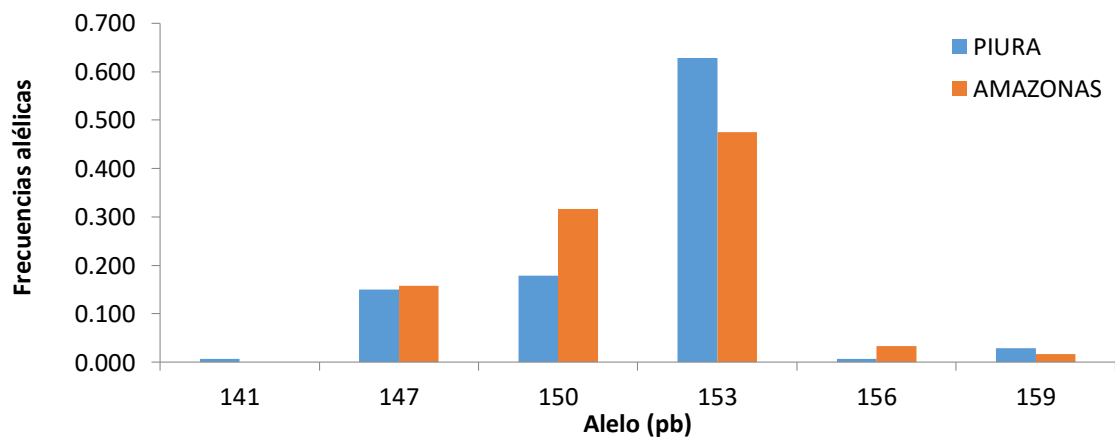


Figura 23. Frecuencias alélicas del marcador CAUD022.

q) CAUD026

El alelo predominante en ambas poblaciones fue el 162 (85.2%, 87.8%). Los demás alelos mostraron frecuencias menores del 10%. La población de Piura presenta el alelo privado 160 mientras que la población de Amazonas, el 142 (Figura 24).

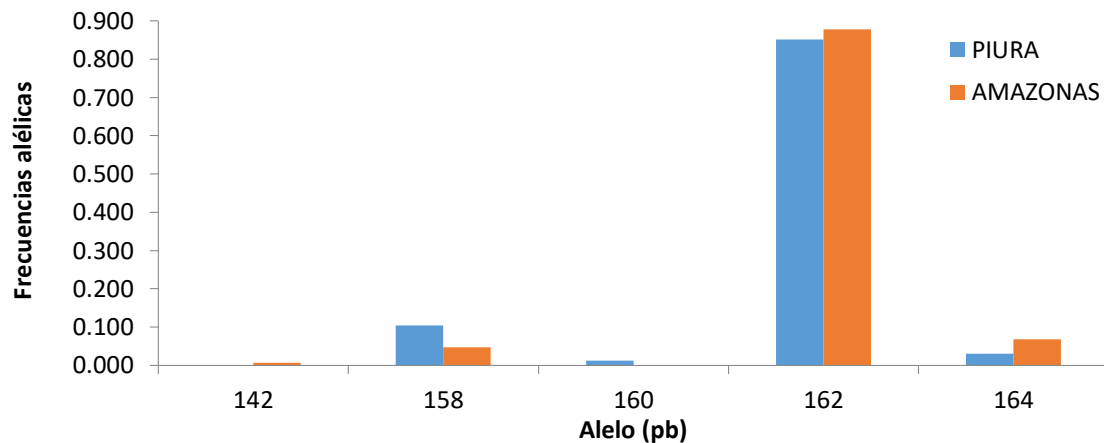


Figura 24. Frecuencias alélicas del marcador CAUD026.

r) CmAAT16

Ambas poblaciones presentaron un total de 8 alelos en común. El alelo más frecuente fue el 193 (53%, 46.3%) y el de menor frecuencia el 211 (0.8%, 0.9%). Los alelos 187, 190, 211 y 226 presentaron una mayor frecuencia en la población de Amazonas; mientras que los alelos 184, 193, 229 y 232 presentaron mayor frecuencia en la población de Piura (Figura 25).

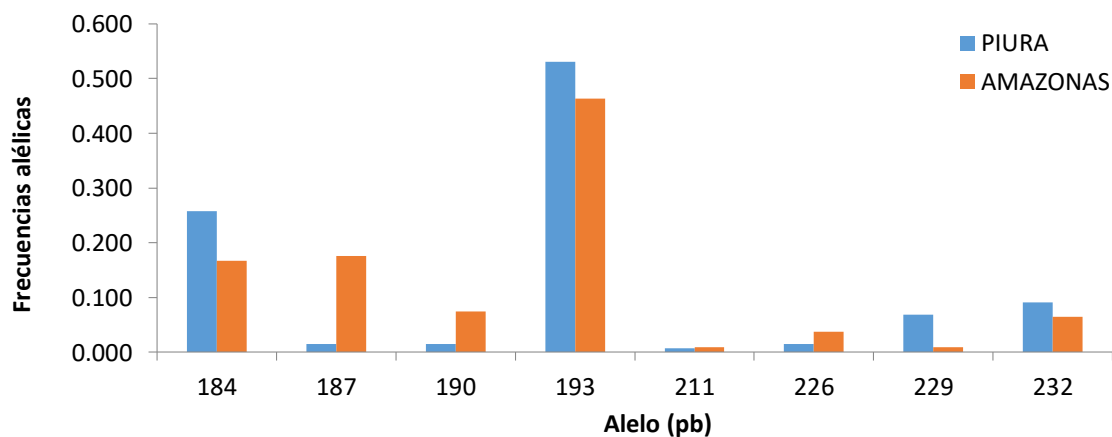


Figura 25. Frecuencias alélicas del marcador CmAAT16.

s) CmAAT35

Se observaron seis alelos en común, de los cuales el de mayor frecuencia fue el 247 (76.9%, 58.6%) y el de menor frecuencia fue el 295 (0.6%, 1.4%). La población de Amazonas presentó tres alelos privados con frecuencias menores al 5%: 241, 256 y 259 (Figura 26).

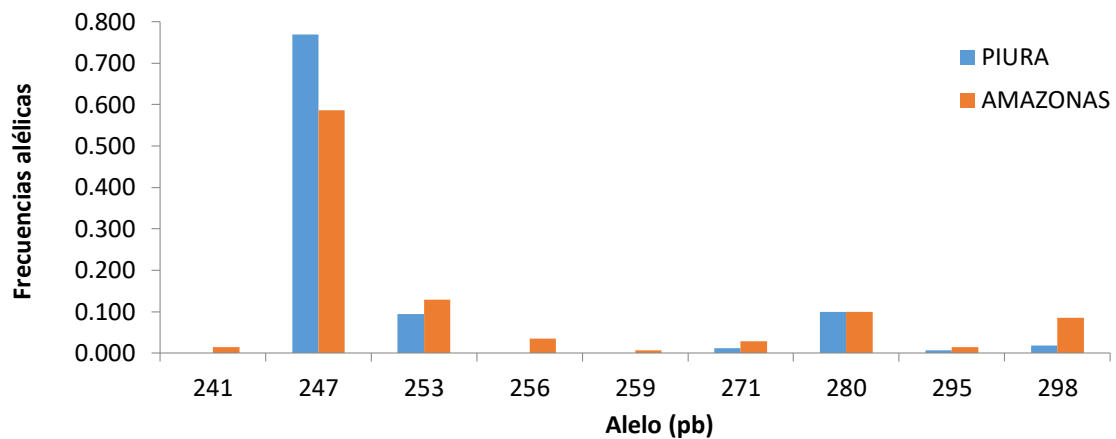


Figura 26. Frecuencias alélicas del marcador CmAAT35.

t) CmAAT38

Presentó un total de 15 alelos, de los cuales 2 fueron exclusivos para la población de Piura y 7 para la población de Amazonas. En la población de Piura se observó que el alelo 146 presento una mayor frecuencia (36.7%). En la población de Amazonas, los alelos más frecuentes fueron 179 (28.2%) y 188 (26.8%), mientras que el alelo 146 presenta un frecuencia menor (17.6%) (Figura 27).

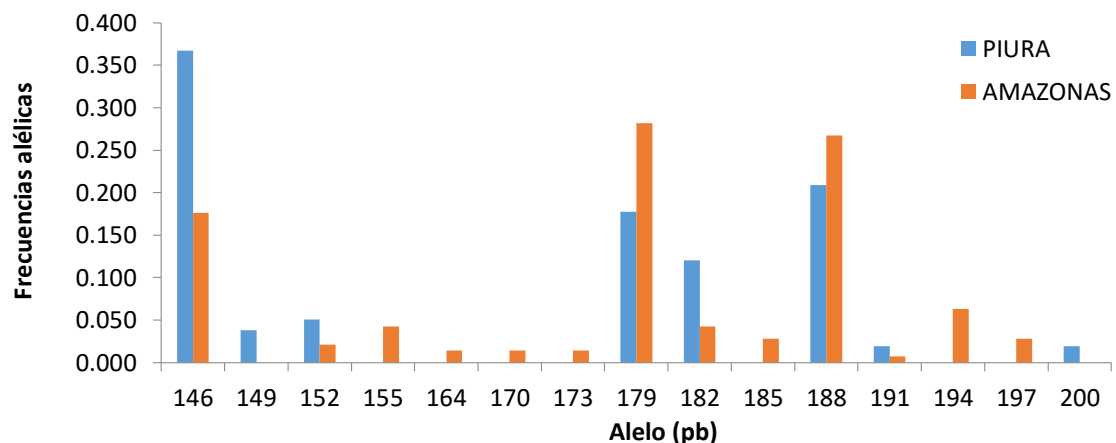


Figura 27. Frecuencias alélicas del marcador CmAAT38.

u) CMO211

La población de Amazonas presentó los alelos privados 120 y 122, ambos de baja frecuencia. El alelo de mayor frecuencia en ambas poblaciones fue el 108 (62.9%, 55.8%) y el de menor frecuencia fue el 128 (1.7%, 3.5%) (Figura 28).

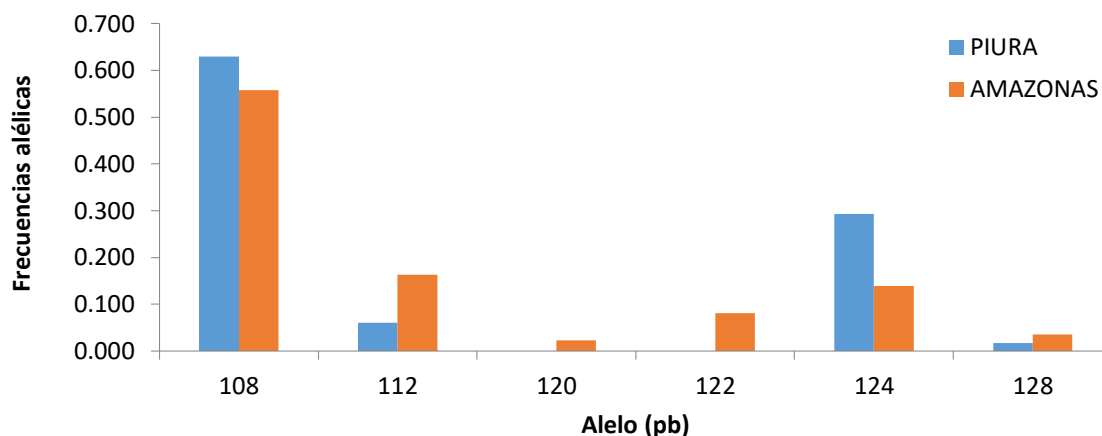


Figura 28. Frecuencias alélicas del marcador CMO211.

También se detectaron alelos raros y alelos muy raros en ambos departamentos, cuyas frecuencias fueron menores a 5% y 1% respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias de alelos raros y alelos muy raros en las poblaciones de Piura y Amazonas.

	AR (f < 5%)	AmR (f < 1%)
Piura	54	23
Amazonas	75	25

AR = Alelos raros, AmR = Alelos muy raros, f = frecuencia

6.3.3. Alelos nulos

Se utilizaron cuatro métodos de análisis (Oosterhout, Chakraborty, Brookfield1 y Brookfield2), donde sí el locus posee al menos uno de los métodos con un cifra mayor a 0.1, se le considera con presencia de alelos nulos. Por lo cual, los loci APH18, APL36, APT004, APT025, CADU24 y CAUD026 no presentaron alelos nulos, mientras que un total de 17 loci de 23 fueron los que sí presentaron alelos nulos (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación de alelos nulos computado en la población total.

Locus	Presencia	Métodos			
		Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
APH07	SI	0.0664	0.082	0.0595	0.172
APH13	SI	0.2725	0.4067	0.2326	0.2326
APH18	NO	0	0	0	0.0488
APL2	SI	0.0771	1	0.0127	0.0127
APL11	SI	0.0786	1	0.0132	0.2015
APL36	NO	0	0	0	0.0803
APL580	SI	0.2162	0.2923	0.1718	0.1718
APT004	NO	0.0115	0	0	0.0246
APT021	SI	0.1186	0.1397	0.1009	0.3809
APT025	NO	0.052	0.0563	0.0455	0.0455
APT029	SI	0.0763	0.0886	0.0699	0.1575
AY285	SI	0.0625	0.0658	0.0587	0.1606
AY294	SI	0.0762	0.0816	0.0721	0.0991
AY295	SI	0.1087	0.1249	0.1053	0.1187
CADU24	NO	0.0602	0.0851	0.0397	0.0836
CADU86	SI	0.2581	0.5579	0.1714	0.5624
CAUD001	SI	0.1621	0.2243	0.1086	0.2025
CAUD022	SI	0.1214	0.1433	0.0946	0.3657
CAUD026	NO	0.0242	0.0114	0.0044	0.0044
CmAAT16	SI	0.2282	0.3131	0.1939	0.4938
CmAAT35	SI	0.1205	0.1438	0.0847	0.1781
CmAAT38	SI	0.1213	0.1353	0.1063	0.1722
CMO211	SI	0.2781	0.4516	0.2276	0.6328

6.3.4. Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El grado de polimorfismo determinado por el PIC exhibe una media de 0.4843 para la población total. El índice más alto (0.91) lo presentó el locus AY294. Por otro lado, los loci APH18 y APL36 mostraron un valor de 0 debido a su condición de marcadores monomórficos. Se reportaron 13 loci altamente informativos ($PIC > 0.5$), entre los que destacan AY285, AY294, AY295 y CmAAT38 (Figura 29).

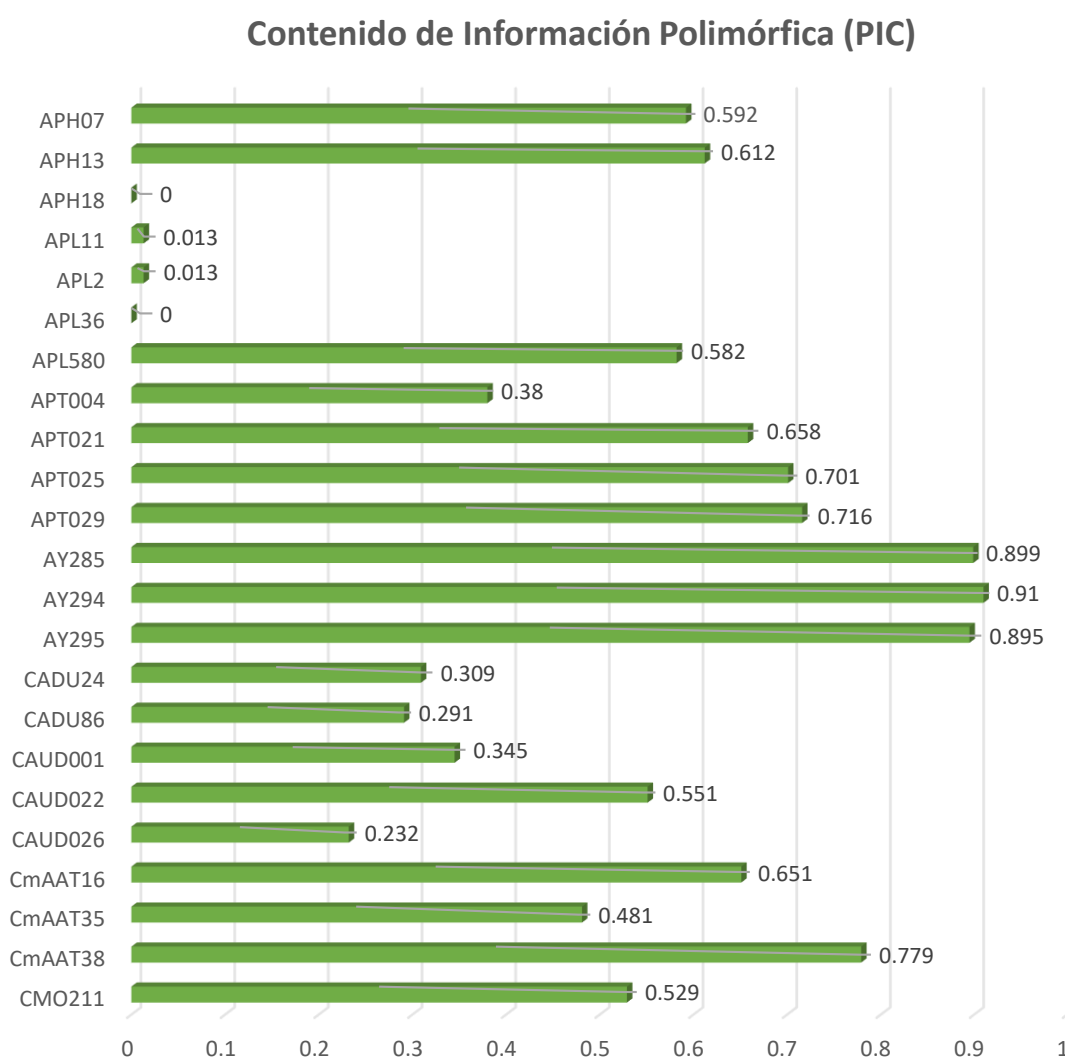


Figura 29. Evaluación del PIC en la población total.

Debido a su bajo valor de PIC, los loci APH18, APL11, APL2 y APL36 fueron excluidos de los análisis posteriores.

6.3.5. Heterocigosidad

En la población de Piura, los valores de heterocigosidad esperada (H_e) fueron más altos que la observada (H_o) en 17 de los 19 loci evaluados, siendo las excepciones APT004 y CAUD026; en la población de Amazonas todos los valores de H_e superaron a los de H_o , lo que indica un déficit de heterocigosidad. Asimismo, en ambas poblaciones, CAUD026 presentó los valores más bajos de H_e (0.262 y 0.222 respectivamente) y AY294 mostró los mayores valores (0.894 y 0.921 respectivamente).

Al analizar la población total, los valores de H_o variaron desde 0.089 (CADU86) hasta 0.795 (AY285) con un promedio de 0.453, mientras que la H_e vario desde 0.245 (CAUD026) hasta 0.919 (AY294) con un promedio de 0.613. Además, todos los índices de H_e fueron mayores a los de H_o , enseñando nuevamente un déficit de heterocigosidad (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación de heterocigosidad calculadas en los departamentos de Piura y Amazonas empleando 19 loci.

Locus	PIURA		AMAZONAS		TOTAL	
	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e
APH07	0.620	0.676	0.464	0.600	0.547	0.647
APH13	0.210	0.654	0.365	0.672	0.284	0.675
APL580	0.358	0.512	0.311	0.669	0.335	0.615
APT004	0.366	0.346	0.493	0.501	0.429	0.430
APT021	0.565	0.686	0.483	0.704	0.528	0.702
APT025	0.679	0.722	0.649	0.760	0.665	0.746
APT029	0.557	0.733	0.714	0.753	0.631	0.756
AY285	0.757	0.888	0.833	0.914	0.795	0.909
AY294	0.741	0.894	0.819	0.921	0.778	0.919
AY295	0.753	0.878	0.644	0.903	0.701	0.905
CADU24	0.296	0.353	0.274	0.321	0.286	0.340
CADU86	0.063	0.267	0.122	0.370	0.089	0.316
CAUD001	0.354	0.442	0.169	0.386	0.267	0.422
CAUD022	0.414	0.550	0.500	0.648	0.454	0.608
CAUD026	0.272	0.262	0.203	0.222	0.239	0.245
CmAAT16	0.348	0.639	0.370	0.716	0.358	0.688
CmAAT35	0.250	0.390	0.529	0.621	0.376	0.507
CmAAT38	0.519	0.771	0.718	0.808	0.613	0.808
CMO211	0.207	0.514	0.233	0.634	0.218	0.579
PROMEDIO	0.438	0.588	0.468	0.638	0.453	0.613

H_o = Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada.

6.3.6. Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)

El análisis de los 19 loci bajo la prueba de EHW reveló que los loci APT004 y CAUD026 se hallaron en EHW. Por otro lado, los loci APT025, AY285 y CADU24 revelaron valores no significativos bajo la corrección de Bonferroni (Tabla 9).

Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) estimado para cada locus en las poblaciones de Piura, Amazonas y total. Bajo la hipótesis alternativa (H1: Existe déficit de heterocigotos o exceso de heterocigotos).

Locus	PIURA		AMAZONAS		TOTAL	
	Déficit de Heterocigotos	Exceso de Heterocigotos	Déficit de Heterocigotos	Exceso de Heterocigotos	Déficit de Heterocigotos	Exceso de Heterocigotos
	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value	p-value
APH07	0.0017†	0.9982	0.002†	0.998	0†	1
APH13	0†	1	0†	1	0†	1
APL580	0†	1	0†	1	0†	1
APT004	0.6886	0.4164	0.6035	0.396	0.6777	0.3375
APT021	0.0017†	0.9981	0†	1	0†	1
APT025	0.3302	0.6862	0.0038*	0.9962	0.0077*	0.9913
APT029	0.0004†	0.9995	0.1271	0.878	0.0004†	0.9988
AY285	0.011*	0.9905	0.025*	0.9716	0.004*	0.9988
AY294	0†	1	0†	1	0†	1
AY295	0.0005†	1	0†	1	0†	1
CADU24	0.0078*	0.9938	0.0912	0.9341	0.0164*	0.9853
CADU86	0†	1	0†	1	0†	1
CAUD001	0.0601	0.9802	0.0016†	0.9984	0.0005†	0.9995
CAUD022	0.0001†	0.9999	0.043*	0.9607	0.0003†	0.9994
CAUD026	0.7149	0.3501	0.1048	0.9271	0.3307	0.6637
CmAAT16	0†	1	0†	1	0†	1
CmAAT35	0†	1	0.0542	0.9599	0.0001†	0.9998
CmAAT38	0†	1	0.1289	0.8682	0.0002†	0.9998
CMO211	0.0014†	0.9986	0†	1	0†	1

p-value = valor de significancia, * $p < 0.05$, † desviación significativa de EHW al aplicar la corrección de Bonferroni, $p < 0.0026$ ($p = 0.05/k = 19$, donde k es el número de loci).

Cuando se realizó el estudio por departamento, se observó que la población de Piura posee 4 loci (APT004, APT025, CAUD001 y CAUD026) sin desviación del EHW, y al aplicar la corrección de Bonferroni los loci AY285 y CADU24 también se encontraron en EHW; por otro lado, la población de Amazonas posee 6 loci (APT004, APT029, CADU24, CAUD026, CmAAT35 y CmAAT38) con un valor de desviación no significativo, mientras que con la corrección de Bonferroni, los loci APT025, AY285 y CAUD022 también se mostraron en EHW (Tabla 9).

6.3.7. Desequilibrio de ligamiento (DL)

Mediante la prueba de DL por población, se evidenció que en las dos poblaciones estudiadas se presentaron marcadores en desequilibrio significativo luego de aplicar la corrección de Bonferroni ($p < 0.00029$). En la población de Piura, 10 (5.84%) comparaciones de marcadores se encontraron en DL significativo de un total de 171 comparaciones. En la población de Amazonas únicamente 5 pares (2.92%) de marcadores se encontraron en DL. En general, dentro de todos los individuos muestreados, se encontraron 15 asociaciones por pares de marcadores (8.77%) estadísticamente significativas de DL. Los marcadores que presentaron un mayor número de loci en DL (cuatro – cinco) fueron AY294 y AY295 (Tabla 10).

Tabla 10. Pares de loci que mostraron desequilibrio de ligamiento entre las 171 asociaciones evaluadas en las poblaciones de Piura, Amazonas y total. Bajo la hipótesis alternativa (H1: Desequilibrio de ligamiento).

DL PIURA			DL AMAZONAS			DL TOTAL		
Locus 1	Locus 2	p-value	Locus 1	Locus 2	p-value	Locus 1	Locus 2	p-value
AY294	CmAAT38	0.00000	AY295	APL580	0.00009	AY294	CmAAT38	0.00000
	AY285	0.00000		CmAAT16	0.00000		AY285	0.00000
	AY295	0.00000		AY285	0.00000		AY295	0.00000
	CAUD022	0.00000		APT025	0.00000		CAUD022	0.00000
	APT025	0.00000	CmAAT16	CAUD001	0.00028		APT025	0.00000
AY295	APL580	0.00000	CAUD001		0.00028	AY295	APL580	0.00000
	CAUD022	0.00000					CmAAT16	0.00000
	APT025	0.00000					AY285	0.00000
CmAAT38	AY285	0.00000					CAUD022	0.00000
APH07	CAUD022	0.00000					APT025	0.00000
CmAAT38						CmAAT38	APL580	0.00020
							CmAAT16	0.00006
							AY285	0.00000
APH07						APH07	CAUD022	0.00000
							APT004	0.00012

p-value = valor de significancia, corrección de Bonferroni, $p < 0.00029$ ($p = 0.05/k = 171$, donde k son las asociaciones en pares totales).

6.4. Análisis de la estructura poblacional

6.4.1. AMOVA y Estadísticos F y R

El AMOVA para los departamentos de Piura y Amazonas reportó que la mayoría de la variación genética proviene de la variabilidad dentro de cada una de las poblaciones (97%), mientras que entre poblaciones es baja (3%). Además, basado en el AMOVA se determinaron los estadísticos F_{ST} así como su análogo estadístico R_{ST} (bajo el *Stepwise Mutation Model*). Se observaron valores bajos en ambos estadísticos (0.0201 y 0.0187 respectivamente), y con un grado de confianza de 0.001 estos resultados fueron considerados como significativos (Tabla 11).

Tabla 11. AMOVA y Estadísticos F_{ST} y R_{ST} para los departamentos de Piura y Amazonas.

FUENTE DE VARIANZA	GL	SC	COMPONENTES DE VARIANZA	VARIANZA ESTIMADA	% DE VARIANZA	F_{ST}	R_{ST}
Entre las poblaciones de Piura y Amazonas	1	52.369	52.369	0.456	3%	0.0201	0.0187
Dentro de las poblaciones de Piura y Amazonas	153	2612.425	17.075	17.075	97%		
Total	154	2664.794		17.531	100%		

GL=Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, F_{ST} y R_{ST} con $p\text{-value} = 0.001$

Por otro lado, al realizar la prueba considerando a las provincias de ambos departamentos como subpoblaciones, la variación genética entre poblaciones aumenta ligeramente (6%) mientras que la variación dentro de las poblaciones sigue siendo dominante (94%); asimismo, tanto para Piura como Amazonas se reportaron que dentro de sus subpoblaciones poseían mayor variación genética (95% y 94% respectivamente) que entre ellas. De igual forma al análisis anterior, se obtuvieron los estadísticos F_{ST} y R_{ST} para estas pruebas, en las que se reportaron un incremento en el valor de ambos estadísticos (0.047 y 0.044 respectivamente) (Tabla 12).

Tabla 12: AMOVA y Estadísticos F_{ST} y R_{ST} para las provincias de Piura y Amazonas.

FUENTE DE VARIANZA	GL	SC	COMPONENTES DE VARIANZA	VARIANZA ESTIMADA	% DE VARIANZA	F_{ST}	R_{ST}
Entre todas las subpoblaciones (provincias)	5	209.998	42.000	1.031	6%	0.047	0.044
Dentro de todas las subpoblaciones (provincias)	149	2454.796	16.475	16.475	94%		
Entre las subpoblaciones de Piura	1	46.081	46.081	0.756	5%	0.035	0.025
Dentro de las subpoblaciones de Piura	79	1266.573	16.033	16.033	95%		
Entre las subpoblaciones de Amazonas	3	111.548	37.183	1.125	6%	0.052	0.056
Dentro de las subpoblaciones de Amazonas	70	1188.223	16.975	16.975	94%		

GL= Grados de libertad, SC=Suma de cuadrados, F_{ST} y R_{ST} con p -value = 0.001.

En relación a los valores F_{ST} y R_{ST} se elaboró una matriz pareada entre las subpoblaciones de las 6 provincias muestreadas. La diferenciación genética entre Morropón, Piura y Bagua fue baja (rango F_{ST} = 0.025 - 0.035, rango R_{ST} = 0.019 – 0.035), mientras que entre las demás provincias fue baja a moderada, donde el mayor valor F_{ST} se registró entre Chachapoyas y Condorcanqui (0.107), mientras que el mayor valor R_{ST} fue entre Condorcanqui y Piura (0.099) (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz pareada de valores F_{ST} (debajo de la diagonal) y valores R_{ST} (encima de la diagonal) entre las provincias de Piura y Amazonas.

	Morropón	Piura	Bagua	Condorcanqui	Chachapoyas	Rodríguez de Mendoza
Morropón		0.025	0.019	0.072	0.098	0.052
Piura	0.035		0.035	0.099	0.072	0.056
Bagua	0.027	0.035		0.039	0.063	0.038
Condorcanqui	0.063	0.084	0.048		0.075	0.056
Chachapoyas	0.075	0.068	0.055	0.107		0.081
Rodríguez de Mendoza	0.033	0.044	0.032	0.044	0.075	

Con respecto al coeficiente de endogamia (F_{IS}), los valores promedio para ambas poblaciones fueron positivos. Con respecto a Piura, se presentaron solo 2 loci con valores negativos (APT004 y CAUD026) mientras que en la población de Amazonas todos los loci presentaron déficit de heterocigotos. El valor de F_{IS} para la población total fue 0.2560, lo cual es indicativo de la presencia de endogamia (Tabla 14).

Tabla 14. Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}) por departamento y total.

Locus	Piura	Amazonas	Total
APH07	0.0889	0.2335	0.1521
APH13	0.6826	0.4627	0.5762
APL580	0.3067	0.5401	0.4338
APT004	-0.0505	0.0245	-0.0067
APT021	0.1829	0.3217	0.2473
APT025	0.0662	0.1533	0.1089
APT029	0.2459	0.058	0.1564
AY285	0.1545	0.0952	0.1248
AY294	0.1779	0.117	0.1488
AY295	0.1481	0.2933	0.218
CADU24	0.1658	0.1542	0.1605
CADU86	0.7659	0.6748	0.7186
CAUD001	0.2035	0.5673	0.364
CAUD022	0.2529	0.2359	0.2444
CAUD026	-0.0295	0.092	0.0235
CmAAT16	0.4605	0.4896	0.4745
CmAAT35	0.3639	0.1552	0.2424
CmAAT38	0.3326	0.1178	0.2284
CMO211	0.6031	0.6403	0.6209
PROMEDIO	0.2541	0.2589	0.2560

Los coeficientes de endogamia por provincia oscilaron a los obtenidos en los promedios por departamento, donde las provincias de Bagua y Condorcanqui mostraron valores más bajos (0.1126 y 0.1883 respectivamente). Así también, el índice promedio de F_{IT} fue 0.2699, lo cual es un estimativo de la reducción de la heterocigosidad de un individuo respecto a la población total (Tabla 15).

Tabla 15. Estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}) por provincias y estimación del coeficiente de consanguinidad total (F_{IT}).

F_{IS} MORROPON	0.2523
F_{IS} PIURA	0.2288
F_{IS} BAGUA	0.1126
F_{IS} CONDORCANQUI	0.1883
F_{IS} CHACHAPOYAS	0.2720
F_{IS} RODRIGUEZ DE MENDOZA	0.2546
PROMEDIO F_{IT}	0.2699

6.4.2. Asignación a grupos por probabilidad bayesiana

Mediante la herramienta en línea ParallelStructure, se realizaron 11 corridas independientes (K de 1 a 11). La representación gráfica en $K=2$ mostró a una gran cantidad de individuos mezclados; sin embargo, tanto en Piura como Amazonas también se observaron zonas con un aporte genético en su mayoría de un solo clúster. En $K=3$ y $K=4$ aquellas zonas destacan: se evidencia que la zona de Amazonas corresponde a los individuos de la provincia de Condorcanqui, mientras que la zona de Piura son individuos pertenecientes a localidades contiguas de colecta de la provincia de Piura. Cuando el $K=5$, el cluster de Condorcanqui es dividido, y con valores mayores de K los agrupamientos no poseen un sentido lógico (Figura 30).

Mediante el análisis con Corrsieve y Structure Selector, se obtuvieron datos y gráficos que permitieron elegir el mejor valor para K , representados por ΔF_{st} y ΔK respectivamente: en ambos métodos el mejor valor es igual a dos (Figura 31, Tabla 16).

Tabla 16. Datos resaltando el mejor valor para K utilizando ParallelStructure y Corrsieve.

K	Reps	Parallel Structure					Corrsieve		
		Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	ΔK	F'(K)	F''(K)	ΔF _{ST}
1	10	-7827.84	0.9228	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	10	-7619.93	2.02707	207.91	60.96	30.07301	0.08283	0.06271	0.74138
3	10	-7472.98	26.13945	146.95	110.51	4.22771	0.02012	0.01988	0.27494
4	10	-7436.54	100.33093	36.44	269.96	2.6907	0.04000	0.03677	0.41100
5	10	-7130.14	33.32934	306.4	182.11	5.46395	0.00323	0.02841	0.30289
6	10	-7005.85	48.76775	124.29	43.16	0.88501	0.03164	0.01185	0.10779
7	10	-6924.72	99.44361	81.13	35.24	0.35437	0.01980	0.01115	0.10287
8	10	-6808.35	20.91997	116.37	19.28	0.92161	0.00865	0.00053	0.00507
9	10	-6711.26	9.58149	97.09	123.81	12.92179	0.00812	0.01147	0.11349
10	10	-6737.98	95.57417	-26.72	13.08	0.13686	0.01958	0.00633	0.05531
11	10	-6777.78	91.97425	-39.8	NA	NA	0.01326	NA	NA

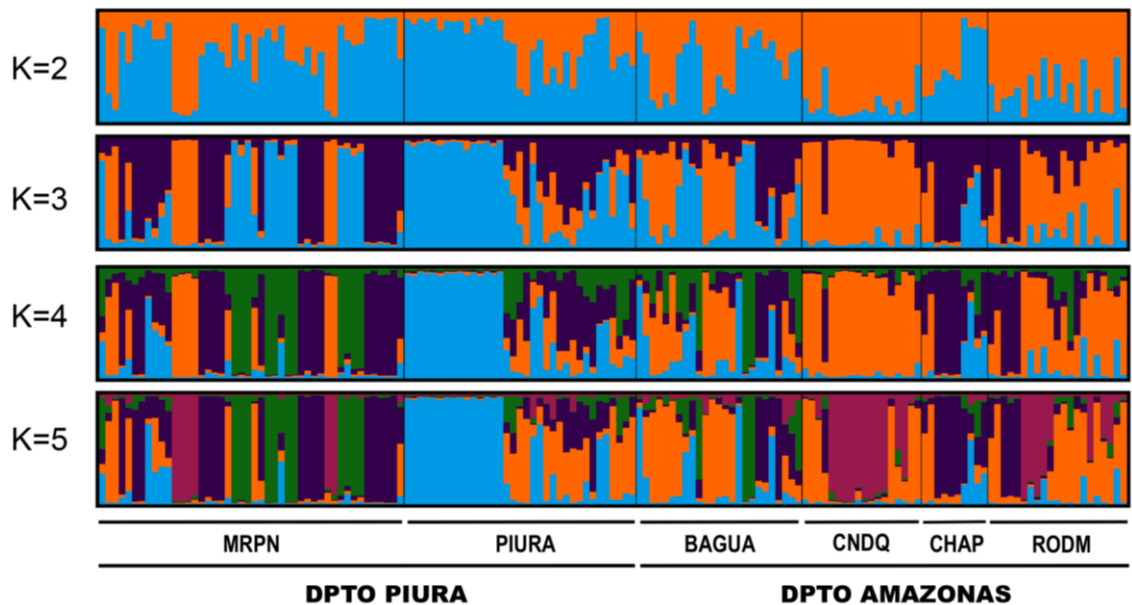


Figura 30. Estructuración de poblaciones domésticas de *C. moschata* a nivel de departamentos y provincias.

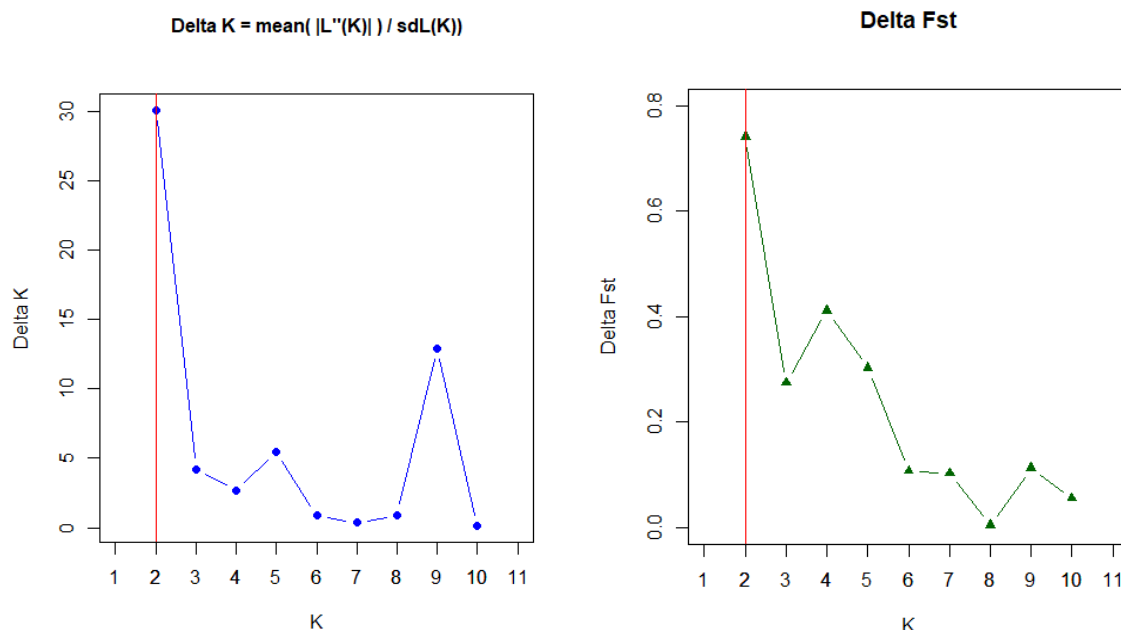


Figura 31. Output generado a partir de las pruebas con Structure Selector y Corrsieve, donde los parámetros más altos de Delta K (ΔK) y Delta Fst (ΔF_{ST}) indican el mejor valor para K.

6.4.3. Asignación a grupos por DAPC

Con el conjunto de datos de microsatélites como base, el método de agrupación por k-medias utilizado por la función *find.clusters* halló que el menor valor de BIC fue $K = 3$ (Anexo 9). Los grupos encontrados poseen tamaños de $K_1 = 52$, $K_2 = 46$ y $K_3 = 57$. La función *xvalDapc* identificó como valor óptimo a 52 componentes principales para realizar el análisis (Anexo 10). Por lo tanto, el DAPC se elaboró utilizando 52 componentes principales retenidos y todas las funciones discriminantes (2 eigenvalores). El gráfico resultante presentó a los grupos inferidos como triángulos, rombos y círculos, los cuales están englobados en una elipse con un 95% de confianza (Figura 32). El grupo 1 contiene en su mayoría a individuos del departamento de Amazonas mientras que los grupos 2 y 3 están conformados por individuos de los departamentos de Piura y Amazonas. Adicionalmente, se determinó la probabilidad de membresía de cada individuo a los tres grupos y se observó que presenta una contribución de más de un *cluster* genético en individuos de ambos departamentos (Anexo 11, Figura 33).

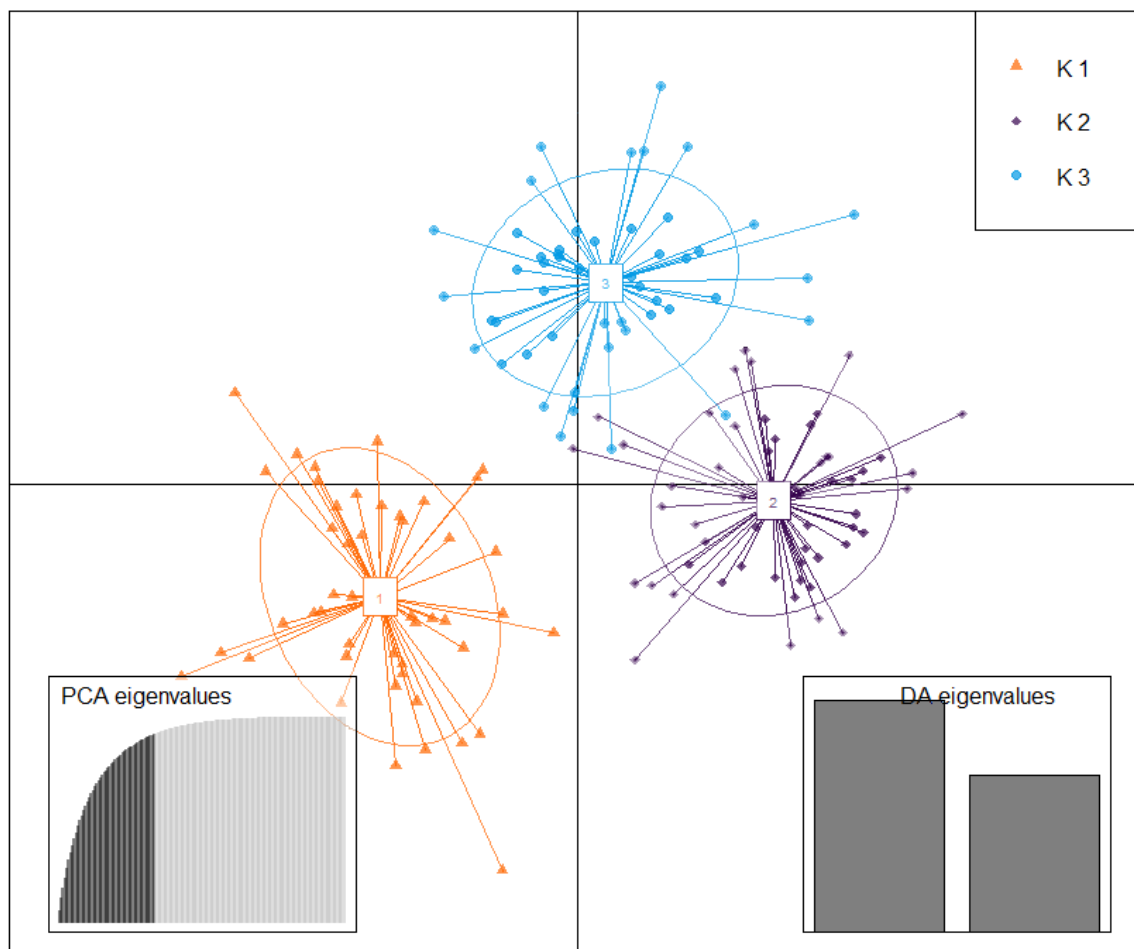


Figura 32. Gráfico de las 155 muestras de patos criollos en los dos primeros factores discriminantes del DAPC, utilizando los *cluster* inferidos con la función *find.clusters* (K1, K2 y K3).

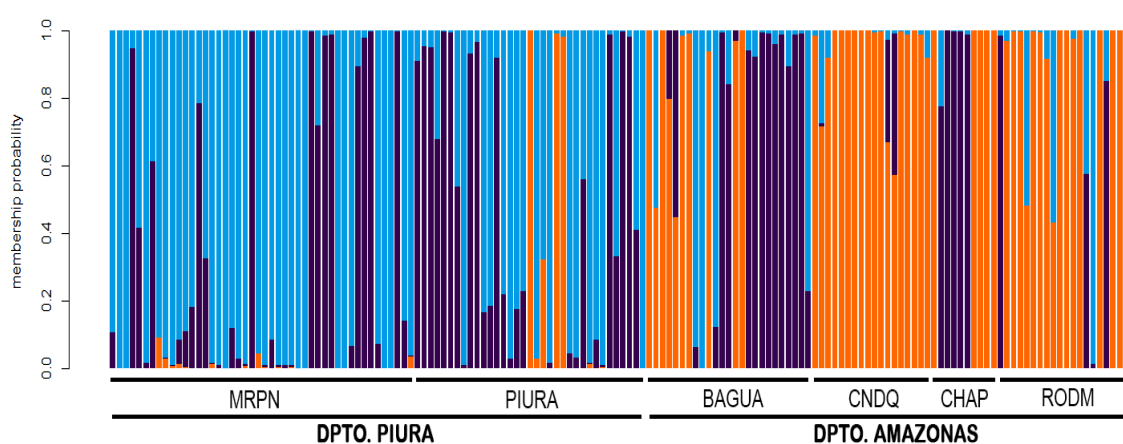


Figura 33. Probabilidad de membresía de cada individuo (a nivel de departamentos y provincias) a los 3 grupos genéticos inferidos por el DAPC.

7. DISCUSIÓN

Como parte de un proyecto de caracterización de los recursos zoogenéticos de importancia para la seguridad alimentaria del Perú, desarrollado por el INIA, se eligieron diferentes comunidades ubicadas en los departamentos de Piura y Amazonas, localizados en el norte del país, donde la crianza de individuos domésticos de *Cairina moschata* es de subsistencia muy antigua. Durante los últimos años, esta institución ha realizado avances que constituyen un acercamiento para el reconocimiento del *C. moschata* como animal de crianza con un arraigo socio-cultural, así también para su valorización como recurso genético y biológico.

Es necesario señalar que en cada departamento se hallaron distintos panoramas en relación a la crianza de los patos crillos. En el departamento de Piura, los individuos son mantenidos en grupos de crianza donde se trabajaba en el manejo de sus poblaciones, probablemente con fines de comercio e intercambio entre criadores locales. En el departamento de Amazonas, la provincia de Bagua practicaba una crianza similar a la de Piura; por otro lado, las otras provincias mantienen a sus individuos en espacios abiertos y el apareamiento es aleatorio, donde el principal motivo de crianza es el autoconsumo. Es importante establecer la situación de crianza como punto de partida al análisis de los resultados de diversidad genética, gracias a esto se podrán realizar medidas para el mejoramiento y conservación de esta especie.

Debido a la insuficiente información de protocolos y cebadores específicos para *C. moschata*, para la investigación sobre la diversidad genética se recurrió además a la transferencia de información de una especie estrechamente relacionada como lo es *A. platyrhynchos* debido a que es uno de los anátida con mayores estudios en este campo.

7.1. Extracción de ADN a partir de plumas

Debido a que las muestras biológicas proceden de animales de crianza familiar son realmente significativas las implicaciones éticas, por lo que fue necesario buscar alternativas para minimizar el estrés para las aves. Publicaciones anteriores han descrito detalles sobre el análisis de las plumas como fuente de ADN así como su utilidad en investigaciones con marcadores moleculares (Smith et al. 2003). Si bien las muestras de sangre pueden producir mayor calidad y cantidad de ADN, el procesamiento para su extracción toma un tiempo considerable si se realiza en campo remoto, es estresante para las aves y puede tener consecuencias relacionadas con la salud (Ferrer y Hiraldo, 1995). Por otro lado, mediante la extracción de plumas es poco probable que ocurra un impacto en la fisiología o la supervivencia de las aves y pueden proporcionar suficiente ADN (Morin y McCarthy, 2007; Rowe et al., 2011). Además de ser una forma rápida y fácil de recolectar una muestra, la colecta de plumas también es una alternativa frente a entornos de campo debido a que se pueden mantener a temperatura ambiente cuando se almacenan correctamente (Rudnick et al., 2009).

Asimismo, las plumas primarias no son necesarias para la recolección de material genético significativo; las plumas de tamaño medio, representadas por las plumas cobertoras secundarias, pueden proporcionar ADN útil (Harvey et al., 2006). Esta clase de pluma proporcionó una cantidad de ADN suficiente para utilizar SSRs. La cantidad del ADN extraído coincidía con la condición del cálamo de la pluma: aquellas de aspecto transparente ofrecían mayor cantidad mientras que las de aspecto amarillento, opaco o quebradizo obtenían menor cantidad (De Volo et al., 2008); además, al momento de la remoción, aquellas plumas que salieron con rastros de sangre presentaron mayor cantidad de ADN ya que la proliferación de células en el cálamo es considerable durante la formación de la pluma (Harvey et al., 2006).

7.2. Amplificación de microsatélites

Se realizaron pruebas de amplificación a un total de 29 loci microsatélites. Se realizaron cambios a nivel de concentración de ADN, de cebadores, $MgCl_2$ y de temperatura de *annealing*.

Se contó únicamente con 4 marcadores diseñados para *C. moschata*, de los cuales solo el locus CmAAT28 presentó severas dificultades para su amplificación, esto posiblemente se deba a que la temperatura de *annealing* recomendada (45 °C) era relativamente baja en comparación a los demás loci (55 – 60 °C), lo cual disminuye la posibilidad de unión entre el cebador y la secuencia de ADN (Stai y Hughes, 2003).

Frente a la pocos cebadores específicos para el pato criollo, se recurrió a la transferibilidad de SSRs de *A. platyrhynchos* donde, de los 25 loci seleccionados, 20 resultaron exitosos ante las pruebas de amplificación. Una posible causa que evita la transferibilidad exitosa de la totalidad de los loci escogidos sería las mutaciones en las secuencias que flanquean las repeticiones de microsatélites, esto se ha demostrado por diversos reportes que demuestran que el éxito de la amplificación de marcadores microsatélite entre distintas especies, así como su tasa de polimorfismo está inversamente relacionado con la distancia filogenética que posean dichas especies (Angers y Bernatchez, 1997; Primmer y Ellegren, 1998; Bech et al., 2010). Dentro de la filogenia de la familia Anatidae se encuentran tanto *C. moschata* como *A. platyrhynchos*. Por otro lado, debido a que ambas especies pertenecen a tribus distintas (tribu Cairinini y Anatini respectivamente), existe cierta distancia filogenética que evita la transferibilidad completa de los marcadores microsatélites (Donne-Goussé et al., 2002).

Los 23 SSR seleccionados se separaron en siete grupos de amplificación bajo tres protocolos de PCR debido a los distintos parámetros que poseía cada locus en particular. Los SSR fueron asignados según su rango de peso molecular, con el propósito de evitar el solapamiento de alelos. Del mismo modo, cada grupo presentó temperaturas específicas para la hibridación. Los grupos FAM-1 y FAM-2, elaborados a

partir del grupo FAM implementado por Acuña (2016), emplearon un mismo protocolo de amplificación (PROTOCOLO 1, Anexo 7). En el caso del grupo FAM-1, los marcadores APL580, CmAAT16 y CmAAT35 requirieron una temperatura de hibridación de 57 °C para reducir la amplificación de inespecíficos. La incorporación del cebador CADU86 en el grupo FAM-2 fue un reemplazo a los cebadores APH15 y CAUD004, los cuales en el trabajo realizado por Acuña (2016) se reportaron como monomórficos. El reemplazo no presentó inconvenientes debido a que el marcador amplificó correctamente con una temperatura de hibridación de 59 °C y su uso no interfirió con la amplificación de los otros marcadores del grupo (APL02, CAUD26 y AY295). El grupo NED-2, elaborado a partir del grupo NED implementado por Acuña (2016), tuvo una baja temperatura de hibridación, debido a que dentro del grupo se encontraba el marcador AY285, que necesitaba una temperatura de *annealing* entre 50°C y 53°C (Huang et al., 2005; Su et al., 2007). Posteriormente, se eligió la temperatura de 53°C debido a que la producción de ruido en los electroferogramas fue mínima. Los grupos NED-1, NED-2 y PET-1 emplearon un protocolo con un mayor número de ciclos en la fase de hibridación (PROTOCOLO 2, Anexo 7) que permitió una mejor amplificación del locus AY285 así como del locus AY294 presente en el grupo PET-1.

7.3. Parámetros indicativos de variabilidad genética

El número de alelos varió considerablemente entre los 23 loci seleccionados, oscilando entre 1 a 34. En relación con los SSRs transferidos de *A. platyrhynchos*, se obtuvieron distintos rangos de alelos, pese a que estudios previos reportan a todos los loci escogidos como polimórficos. Para los loci APH07, APH13 y APH18 los estudios presentan 17, 6 y 4 alelos respectivamente (Maak et al., 2003; Baratti et al., 2009). Sin embargo, en las poblaciones de Piura y Amazonas el locus APH18 se presenta como monomórfico, mientras que los loci APH07 y APH13 el número de alelos se reduce a 6 y 4 respectivamente. Los loci APL2 y APL11 se observaron como monomórficos en las

poblaciones de Amazonas y Piura respectivamente, mientras que el locus APL36 fue monomórfico en ambas poblaciones. Estos resultados difieren drásticamente con los loci altamente polimórficos descritos por Denk et al. (2004), lo cual corrobora su aseveración que indica que estos marcadores pueden tener un uso particular para estudios en *A. platyrhynchos*. Debido a esto, el rango de alelos sin tomar en cuenta a los loci monomórficos cambia de 3 a 34.

Investigaciones previas también reportan el éxito de la transferibilidad de marcadores en *C. moschata*, tal es el caso con los marcadores APL580 y CMO211 en poblaciones introducidas en China con un número de alelos de 10 y 8 para cada loci (Zhao et al., 2005), dicho número de alelos es cercano a los hallados en este estudio (12 y 6 respectivamente). Otro reporte es el grupo de 18 loci transferidos, realizado en poblaciones de los departamentos de San Martín y Lambayeque los cuales presentan un rango de alelos de 3 a 34 al excluir los loci monomórficos (Acuña, 2016), coincidiendo con el rango presentado en este estudio y cuyo número mayor de alelos se presenta también en el locus AY295, incluso cuando el trabajo citado presenta un mayor número de individuos analizados (N = 352). En la misma línea de comparación, se observó una tendencia en algunos marcadores que señalan tanto a Lambayeque como Piura con una menor cantidad de alelos que San Martín y Amazonas respectivamente, esto posiblemente sea a causa de la tendencia de ciertos SSRs empleados a mutar con mayor facilidad (Oliveira et al., 2006).

Los marcadores diseñados para *C. moschata* CmAAT16, CmAAT35 y CmAAT38 mostraron un alto polimorfismo en ambas poblaciones, lo cual se adecua a los resultados obtenidos en poblaciones domésticas de Brasil y Paraguay (Stai y Hughes, 2003). El estudio realizado por Conto (2014) en individuos de Piura y Lambayeque reporta que el locus CmAAT35 presenta al alelo de 249 pb con una alta frecuencia alélica (81.7%); sin embargo, en las dos poblaciones estudiadas en esta investigación, la frecuencia más alta pertenece al alelo 247 (76.9%); del mismo modo, los 3 alelos

restantes reportados en dicho locus presentan un patrón similar con los encontrados en este estudio a pesar de que el tamaño difiere en 2 pb por cada alelo, este cambio probablemente se deba al efecto “*dye shift*” presente en sistemas de marcaje dual de cebadores como el utilizado con la cola M13, lo cual provoca que la movilidad de los fragmentos de PCR durante la electroforesis varíe al utilizar diferentes fluoróforos, lo que puede llevar a diferentes estimaciones de tamaño de un alelo (Sutton et al., 2011).

Ambas poblaciones presentaron alelos privados, los cuales se caracterizaron por poseer en su mayoría muy bajas frecuencias (<1.5%): la población de Amazonas contó con 46 de estos alelos, mientras que la población de Piura contó con 25. El contraste en el número de alelos privados entre poblaciones, así como en el número total de alelos, señala que la población de Amazonas poseería una mayor diversidad alélica que la de Piura. Además, en la población de Piura se reportaron 54 alelos raros (AR) y 23 alelos muy raros (AmR) mientras que la población de Amazonas presentó 75 y 25 respectivamente. En los estudios de diversidad genética que utilizan loci microsatélites, son una característica común la presencia de AR (frecuencia < 5%) y AmR (frecuencia < 1%) debido a la alta tasa de mutación de estos marcadores, lo que ocasiona un cambio en la frecuencia alélica o en la aparición de nuevos alelos. Los AmR casi no proporcionan información útil para los análisis de diversidad debido a que su presencia pueda ser a causa de mutaciones recurrentes en lugar de asociación histórica o flujo génico; sin embargo pueden ser de utilidad para estudios de parentesco y de conservación del material genético (Hale et al., 2012).

La detección de alelos nulos fue significativa, donde solo 6 loci de los 23 analizados resultaron libres de esta prueba: APH18, APL36, APT004, APT025, CADU24 y CAUD026. Los alelos nulos en loci microsatélite ocurren con frecuencia debido a mutaciones en uno o en ambos sitios de unión al cebador, suficiente para evitar la amplificación efectiva de los alelos. Este problema es particularmente común en casos de transferibilidad de marcadores (Pemberton et al., 1995). La presencia de alelos nulos

puede provocar un incremento de falsa homocigosidad a nivel poblacional así como una ligera sobreestimación del F_{ST} (Carlsson, 2008). Por lo tanto, se necesita la debida precaución para la interpretación certera de la diversidad genética y la estructuración genética de las poblaciones estudiadas.

De acuerdo a los parámetros establecidos por Botstein et al. (1980) para la evaluación del PIC, 13 de los 23 loci resultaron tener alta diversidad (APH07, APH13, APL580, APT021, APT025, APT029, AY285, AY294, AY295, CAUD22, CmAAT16, CmAAT38 y CMO211), mientras que 5 reflejaron una diversidad intermedia (APT004, CADU24, CADU86, CAUD001 y CmAAT35). Por otro lado, aunque el locus CAUD026 se encuentra dentro del rango de baja diversidad, el valor que presenta (0.232) no es excesivamente bajo como para descartarlo del análisis de diversidad genética; además, es uno de los loci libre de la presencia de alelos nulos por lo que no debería ocasionar sesgo en los análisis. Debido a que el PIC es un índice eficaz para la estimación del polimorfismo en marcadores microsatélites, se decidió el uso solamente de los 19 loci anteriormente mencionados para los posteriores análisis con la finalidad de proporcionar un resultado más robusto de la diversidad genética de las poblaciones bajo estudio.

Mediante el análisis de los niveles de heterocigosidad, se reportó que los valores de heterocigosidad observada en 10 de los 19 loci escogidos sobrepasan el 0.5, mientras que el promedio está ligeramente cercano al 0.5 ($H_o = 0.453$), lo cual indica que los marcadores microsatélites fueron adecuados para el análisis de la diversidad genética (Sheriff y Alemayehu, 2018). Además, la H_o promedio fue superior a las reportadas por Conto (2014) y Acuña (2016) en poblaciones de patos criollos del territorio peruano ($H_o = 0.361$ y $H_o = 0.413$ respectivamente). Del mismo modo, la heterocigosidad esperada promedio mostrada en este estudio ($H_e = 0.613$) resultó por encima de los anteriores reportes citados para poblaciones de *C. moschata* en Perú ($H_e = 0.438$ y $H_e = 0.601$ respectivamente). La H_e promedio también indica un grado de diversidad genética moderada, debido a que este valor es cercano al 0.5, un valor esperado en animales

que han pasado un proceso de domesticación (Lopez-Zavala et al., 2013). La heterocigosidad hallada en este análisis también resultó ubicarse por encima de los índices hallados para poblaciones de *C. moschata* de Alemania ($H_e = 0.569$) (Maak et al., 2003) y de Irán ($H_e = 0.410$) (Ahmadi et al., 2007), lo cual se ajusta a la cercanía geográfica de Perú a un posible centro de origen de la forma doméstica de esta especie. Asimismo, la H_e promedio de los individuos de Brasil reportado por Stai y Hughes (2003) muestra un valor mucho más alto ($H_e = 0.901$), lo cual es correspondiente al pertenecer a una población silvestre.

Adicionalmente, se halló una diferencia entre la H_e promedio entre las poblaciones de Piura y Amazonas, resultando en 0.588 y 0.638 respectivamente, por lo cual el departamento de Piura refleja una diversidad genética menor que Amazonas. Esta predilección también se registró en el análisis de la diversidad alélica. Además, el mismo patrón se observa en el estudio de Acuña (2016) entre los valores de H_e promedio de las poblaciones de Lambayeque y San Martín, con valores de 0.491 y 0.591 respectivamente. Esta disposición podría tener un origen en el modelo de crianza que poseen en cada departamento en particular: Acuña (2016) sostiene que los centros poblados de Lambayeque cuentan un modelo de crianza levemente organizado y con trabajos de mejoramiento de sus poblaciones, mientras que en los centros poblados de San Martín no cuentan con una crianza controlada. Ambos casos son similares a los modelos de crianza encontrados en Piura y Amazonas, respectivamente. El menor valor de H_e y de la diversidad alélica de un departamento a otro posiblemente sea el resultado de la pérdida de diversidad genética debido a la selección artificial constante a la que son sometidas las especies domésticas (FAO 2007), esto es de esperar por los modelos de crianza descritos en los departamentos de la costa peruana.

Los valores de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg mostraron que el 73.7% de los loci evaluados estuvieron en desequilibrio, considerando la corrección de Bonferroni ($p\text{-value} < 0.0026$). La desviación de EHW en la población total tiene una causa probable

en el déficit de heterocigotos presente en los marcadores utilizados. Este resultado está correlacionado con lo previamente descrito en este estudio como la alta presencia de alelos nulos, posibles eventos de endogamia provocados por un modelo de crianza abierto y la presión selectiva causada por la búsqueda de mejores características en el pato criollo. La combinación de estos factores podría estar ocasionando el incumplimiento de los supuestos del EHW en la población total (Frankham et al., 2002; Chapuis y Estoup, 2006; Allendorf y Luikart, 2007).

La prueba de desequilibrio de ligamiento reveló que los marcadores AY294 y AY295 se encontraron con un mayor número de loci en DL. No obstante, el mapa de ligamiento genético para *A. platyrhynchos* desarrollado por Huang et al. (2006) (Anexo 12), a partir de 115 SSRs, dentro de los cuales incluye a los marcadores APH07, AY285, AY294, AY295, CAUD001 y CmAAT16 utilizados en este estudio, coloca a los seis marcadores mencionados en grupos de ligamiento independientes. Por lo tanto, una posible causa del DL serían las mutaciones recurrentes características de la transferibilidad de marcadores y la consiguiente generación de alelos raros (Slatkin, 2008). De todo el grupo de microsatélites analizados, la proporción de loci en DL fue baja (8.77%), por lo cual el DL no debería causar sobreestimación de los resultados de estructuración genética (Kaeuffer et al., 2007).

En estudios de diversidad genética basados en técnicas moleculares distintas a los SSRs se hallaron niveles que fueron considerados bajos a moderados según sus respectivos autores. Mediante el empleo de RAPDs, El-Gendy et al. (2005) reportaron un valor promedio de variabilidad genética de 0.41 en la raza local egipcia Sudani y 0.27 en patos criollos importados. Hernández et al. (2007) con el uso de RAMs hallaron valores de heterocigosidad de 0.16 a 0.23 en poblaciones de patos criollos de Colombia. Otros estudios utilizaron secuencias de ADN mitocondrial, los cuales describen diversidad genética limitada, donde el nivel máximo de diversidad estuvo representado por la presencia de 12 haplotipos observados en 84 individuos provenientes de China,

India y Francia (Chen et al., 2009; Sun et al., 2012; Paramasivam et al., 2017). En contraste, el grado de polimorfismo obtenido en el grupo de SSRs seleccionados permitió caracterizar a las poblaciones estudiadas con un moderado nivel de variabilidad y notoriamente mayor a otras técnicas.

7.4. Análisis de estructura poblacional

El AMOVA indicó que la mayor parte de la variación genética total observada fue atribuible dentro de las poblaciones de Piura y Amazonas (94%) mientras que entre poblaciones es mínima (6%). El mismo patrón de baja diferenciación se encuentra al analizar las subpoblaciones contenidas en ellas (Entre subpoblaciones de Piura = 5% y Entre subpoblaciones de Amazonas = 6%). Los resultados se ajustan con el bajo y significativo valor de F_{ST} (0.047) a nivel poblacional. Asimismo, el estadístico R_{ST} utilizado para evitar la sobreestimación del grado de diferenciación genética causado por la alta y compleja tasa de mutación de los microsatélites (Estoup et al. 2002, Hardy et al. 2003), mostró un índice bajo (0.044) que refuerza el valor de F_{ST} , lo cual es un indicio de escasa diferenciación genética entre ambos departamentos.

Los valores obtenidos en las matrices pareadas de F_{ST} y R_{ST} también mostraron una baja diferenciación genética entre las provincias de Morropón y Piura, resultado posiblemente condicionado por el transporte continuo de patos criollos entre comerciantes y criadores de estas provincias, y que es correspondiente a lo reportado por Conto (2014) con poblaciones pertenecientes a comercios de Lambayeque y Piura que mostraron valores pareados de F_{ST} menores de 0.05. Por otro lado, los valores pareados aumentan a un nivel de diferenciación moderada entre las tres provincias anteriormente mencionadas con aquellas de Amazonas más alejadas geográficamente (Condorcanqui, Chachapoyas y Rodríguez de Mendoza), donde el comercio y traslado de aves de corral entre centros poblados es complicado debido a las condiciones de las vías de comunicación, así como a accidentes geográficos característicos de la selva

peruana. La presencia de diferenciación genética entre regiones de la costa y la selva es un factor a considerar en la mejora reproductiva de esta especie, así como su conservación.

Los coeficientes de endogamia (F_{IS}) en la mayoría de loci presentaron valores altos y positivos, estos resultados son compatibles con el déficit de heterocigotos presentado en la prueba de EHW. A su vez, el valor promedio de F_{IS} también es positivo (0.2560), así como los índices de endogamia a nivel de subpoblaciones que se acercan a dicho valor, lo cual corroboraría un grado moderado de endogamia en la población total. A pesar de que la detección de alelos nulos en este estudio puede ser causante de falsa homocigosidad y en consecuencia afectar los niveles de F_{IS} , los valores obtenidos son similares a los hallados en el trabajo de Acuña (2016) con respecto a las grupos muestreados en los alrededores de San Martín y Lambayeque (0.295 y 0.221 respectivamente), donde relaciona estos resultados con la crianza familiar y la introducción no controlada de machos reproductores, situación que también experimentan los centros poblados de este estudio y que pone en riesgo a futuras poblaciones de patos criollo.

Para el análisis de estructuración fue necesario determinar la pertenencia a grupos genéticos mediante el software ParallelStructure y de la función *dapc*, donde se utilizaron tanto el método de clasificación basado en un modelo de agrupación (Pritchard et al., 2000) como el método multivariado (Jombart et al., 2010), respectivamente.

El programa ParallelStructure proyectó resultados no consistentes en cuanto al número de grupos, observándose pequeñas zonas discretas en cada departamento asociadas a un grupo genético definido mientras que varios individuos presentaban contribución de más de un grupo genético. Mediante los métodos de ΔK (Evanno et al. 2005) y ΔF_{ST} (Campana et al. 2011) se reconocieron los valores de probabilidad conseguidos en la prueba de estructuración ($K=2$ a 11), donde $K=2$ resultó el número ideal de poblaciones. Aunque el número de grupos hallados concuerda con las características mencionadas

en el análisis de F_{ST} relacionadas a los contrastes entre las regiones de la costa y la selva, no se reconoce una estructura marcada que diferencie a cada departamento. Además, se debe mencionar que el software ParallelStructure está diseñado sobre la base de suposiciones como el EHW y equilibrio de ligamiento (Pritchard et al., 2000), por lo que los resultados pudieran haberse visto afectados por la presencia de loci en este estudio que no cumplen estos requisitos.

El método de agrupamiento k-medias realizado por la función *find.clusters* identificó 3 grupos donde se muestra una gran parte de la población de Amazonas en el grupo K1 y, del mismo modo, el grupo K3 presenta una mayor cantidad de individuos procedentes del departamento de Piura; por otro lado, el grupo K2 no guarda relación concreta con la procedencia de los individuos. El gráfico de DAPC muestra que los grupos K2 y K3 se encuentran próximos y que ambos mantienen distancia del grupo K1. Sin embargo, existe la posibilidad de que el grupo K2 haya sido erróneamente inferido debido al muestreo espacialmente heterogéneo que poseen algunas subpoblaciones (Jombart et al., 2010). Mediante la probabilidad de membresía se comprobó que la mayoría de individuos presentan contribución de más de un grupo, por lo que no se puede establecer una estructura genética definida entre las subpoblaciones.

Los resultados obtenidos a partir de los dos enfoques de estructuración poblacional, así como de los estadísticos F arrojan que las poblaciones de Piura y Amazonas tendrían una baja diferenciación genética entre ellas. Además, en cada apartado mencionado también se han notado los paralelismos que poseen estas poblaciones con sus similares de Lambayeque y San Martín presentados en el trabajo de Acuña (2016), con el enfoque principal en la tendencia a la reducción de la variabilidad genética del pato criollo. De seguir con esta tendencia, las poblaciones domésticas podrían ver limitada su habilidad para responder a un ambiente cambiante, lo que ocasionaría el descenso del potencial reproductivo de los individuos, generando una disminución del tamaño de la población

y, por consiguiente, afectaría negativamente la seguridad alimentaria de varias regiones del Perú.

Este trabajo aporta conocimiento acerca de la diversidad genética en dos zonas de impacto histórico, social y económico en lo que respecta a la crianza de patos criollos como lo son la costa y selva peruanas, los cuales servirán para el diseño de programas de manejo y mejoramiento genético que aseguren la conservación de esta especie y un incremento de su valor como recurso biológico.

8. CONCLUSIONES

- Se determinaron un total de 19 loci que presentan un contenido de información polimórfica que es considerado útil para estudios de diversidad genética: 13 altamente informativos, 5 razonablemente informativos y 1 ligeramente informativo.
- Se presentó una moderada diversidad genética en la población total de patos criollos evaluados, siendo la población de Amazonas la que exhibió mayor diversidad.
- Los análisis de estructuración genética no encontraron una estructura entre las poblaciones de patos criollos.

9. RECOMENDACIONES

- Si se recurre a utilizar sistemas de marcaje dual como el de la cola M13 junto a distintas combinaciones de fluoróforos, son necesarios métodos estrictos de control de calidad y un manejo detallado de los datos para evitar potenciales errores de genotipado, tales como una escala de tamaño alélico por fluoróforo o establecer un tamaño alélico puro.
- El método de transferibilidad de marcadores microsatélite debe ser empleado con cautela, debido a que cuanto más distantes sean las especies implicadas menor éxito tendrá la transferencia.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, W. "Determinación de la diversidad y estructura genética de patos criollos (*Cairina moschata* L. 1758) de los departamentos de Lambayeque y San Martín mediante el uso de microsatélites". Asesores: Mónica Arakaki, Eudosio Veli. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, Lima, Perú, 2016.
- AHMADI, K.; RAHIMI, G.; VAF AEI, A. et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina moschata*) duck populations. *International Journal of Poultry Science*. 2007, vol. 6, nº 5, p. 378-382.
- ALLENDORF, F. & LUIKART, G. *Conservation and the genetics of populations*. 1ra ed. Maiden, MA, EE.UU: Blackwell Publishing. 2007. 642 p. ISBN-13: 978-1-4051-2145-3
- ANGERS, B. & BERNATCHEZ, L. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution*. 1997, vol. 14, nº 3, p. 230-238.
- ANGULO, E. Interpretación biológica acerca de la domesticación del pato criollo (*Cairina moschata*). *Bulletin de l'Institut français d'études andines*. 1998, vol. 27, nº 1.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; ROMÁN-BRAVO, R.; ISEA, W. et al. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 2005, vol 13, nº 1, p. 30-42
- BACHER, J.; HENNES, L. F.; GU, T. et al. Pentanucleotide repeats: highly polymorphic genetic markers displaying minimal stutter artifact. En *Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification*. 1999. p. 24–37.

- BALDASSARRE, G. *Ducks, geese, and swans of North America*. JHU Press, 2014.
- Disponibile en: <<https://books.google.com.pe/books?id=fnkZBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>>
- BARATTI, M.; CORDARO, M.; DESSI-FULGHERI, F. et al. Molecular and ecological characterization of urban populations of the mallard (*Anas platyrhynchos* L.) in Italy. *Italian Journal of Zoology*. 2009, vol. 76, n° 3, p. 330-339.
- BECH, N.; NOVOA, C.; ALLIENNE, J. et al. Transferability of microsatellite markers among economically and ecologically important galliform birds. *Genetics and Molecular Research*. 2010, vol. 9, n° 2: p. 1121–1129.
- BEJA-PEREIRA, A. et al. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, 2009, vol. 9, no 5, p. 1279-1301.
- BELLO, N.; FRANCINO, O. & SÁNCHEZ, A. Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2001, vol. 13, n° 2, p. 162-164.
- BESNIER, F. & GLOVER, K. ParallelStructure: AR package to distribute parallel runs of the population genetics program STRUCTURE on multi-core computers. *PLoS One*. 2013, vol. 8, n° 7, p. e70651
- BOLTON, P.; WEST, A.; CARDILINI, A. et al. Three molecular markers show no evidence of population genetic structure in the Gouldian fish (*Erythrura gouldiae*). *PLoS One*. 2016, vol 11, n° 12, p. 1-19.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980, vol. 32, n° 3, p. 314.
- BUTLER, J. *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR markers*. 2da ed. MA, EE. UU: Academic Press, 2005, 660 p. ISBN: 0-12-147952-8.
- CAMPANA, M.; HUNT, H.; JONES, H. et al. CorrSieve: software for summarizing and evaluating Structure output. *Molecular Ecology Resources*. 2011, vol. 11, n° 2, p. 349-352.

- CARBONERAS, C. Family Anatidae (Ducks, Geese and Swans). En: DEL HOYO, J., ELLIOTT, A. & SARGATAL, J. (edit.) *Handbook of the Birds of the World*, vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona. 1992, p. 528–628
- CARLSSON, J. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity*. 2008, vol. 99, nº 6, p. 616-623.
- CENAGRO. 2012. [en línea]. IV Censo Nacional Agropecuario. Disponible en: <<https://www.inei.gob.pe/estadisticas/censos/>>. Revisado: enero 2018.
- CHAPUIS, M. & ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2006, vol. 24, nº 3, p. 621-631.
- CHEN, S.; HE, D. & LIU, Y. Low genetic variability of domestic Muscovy duck (*Cairina moschata*) in China revealed by mitochondrial DNA control region sequences. *Biochemical Genetics*. 2009, vol. 47, nº 9-10, p. 734-738.
- CHRISTEL, M.; KATIA, F.; CARINE, G. et al. Microsatellite DNA markers for duck (*Anas platyrhynchos* and *Cairina moschata*). En *Proceedings of Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture*. 2006. p. 165-168.
- CIRIACO, P. Producción de patos criollos. *Manual de crianza Universidad Nacional Agraria La Molina*. La Molina. Lima, Perú. 1999.
- COLONNA, V.; NUTILE, T.; FERRUCCI, R. et al. Comparing population structure as inferred from genealogical versus genetic information. *European Journal of Human Genetics*. 2009, vol. 17, nº 12, p. 1635.
- CONTO, K. G. “Estudio de la diversidad genética del pato criollo doméstico (*Cairina moschata*) en la Costa Norte Peruana utilizando marcadores microsatélites”. Asesora: María Arana. Tesis Título Profesional, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”, Lima, Perú. 2014.
- CROW, J. & KIMURA, M. *An introduction to population genetics theory*. NY, EE.UU: Harper y Row, Publishers, Inc. 1970. 591 p. ISBN-13: 978-1-932846-12-6

- CULLEY, T.; STAMPER, T.; STOLES, R. et al. An efficient technique for primer development and application that integrates fluorescent labeling and multiplex PCR. *Applications in Plant Sciences*. 2013, vol 1, num 10, p. 1-10.
- DELGADO, J.; MARTÍNEZ, A.; ACOSTA, A. et al. Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2012, vol. 43, nº 1, p. 2-10.
- DENK, A.; GAUTSCHI, B.; CARTER, K. et al. Seven polymorphic microsatellite loci for paternity assessment in the mallard (*Anas platyrhynchos*). *Molecular Ecology Notes*. 2004, vol. 4, nº 3, p. 506-508.
- DEYL, Z.; MIKŠÍK, I. & TAGLIARO, F. Advances in capillary electrophoresis. *Forensic Science International*. 1998, vol. 92, nº 2-3, p. 89-124.
- DE VOLO, S.; REYNOLDS, R.; DOUGLAS, M. et al. An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *The Condor*. 2008, vol. 110, nº 4, p. 762-766.
- DONKIN, R. *The Muscovy Duck: Cairina Moschata Domestica: Origins, Dispersal, and Associated Aspects of the Geography of Domestication*. Rotterdam: A.A. Balkema. 1989.
- DONNE-GOUSSÉ, C.; LAUDET, V. & HÄNNI, C. A molecular phylogeny of anseriformes based on mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2002, vol. 23, nº 3, p. 339-356.
- EDWARDS, M. & GIBBS, R. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Research*. 1994, vol. 3, nº 4, p. S65-S75.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.; JIN, L. et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*. 1992, vol. 12, nº 2, p. 241-253.
- EL-GENDY, E.; HELAL, M.; GOHER, N. et al. Molecular characterization of genetic biodiversity in ducks, using RAPD-PCR analysis. *Arab J. Biotech.* 2005, vol. 8, nº 2, p. 253-264.

- EGUIARTE, L.; AGUIRRE-PLANTER, E.; SCHEINVAR, E. et al. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 2010, p. 30.
- ESTOUP, A.; JARNE, P. & CORNUET, J. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 2002, vol. 11, nº 9, p. 1591-1604.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. & GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005, vol. 14, nº 8, p. 2611-2620.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. & QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992, vol. 131, nº 2, p. 479-491.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003, vol. 164, nº 4, p. 1567-1587.
- FAO. 2014. [en línea]. *Domestic animal diversity information system (DAD-IS)*, FAO, United Nations. Disponible en: <<http://dad.fao.org/>>
- FAO. 2007. [en línea]. *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*. FAO, Rome, Italia. Disponible en: <<http://www.fao.org/3/a1250e/a1250e.pdf>>
- FERRER, M. & HIRALDO, F. Human-associated staphylococcal infection in Spanish imperial eagles. *Journal of Wildlife Diseases*. 1995, vol. 31, nº 4, p. 534-536.
- FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. & BALLOU, J. *Introduction to conservation genetics*. 1ra ed. NY, EE.UU: Cambridge University Press. 2002. 617 p. ISBN: 0-521-63985-9.
- FREELAND, J.; KIRK, H. & PETERSEN, S. Molecular markers in ecology. *Molecular Ecology (Ed. H. Kirk.)*, 2005, p. 31-62.

- GAGNEUX, P.; BOESCH, C. & WOODRUFF, D. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology*, 1997, vol. 6, no 9, p. 861-868.
- GAMBOA, J. El pato, la chicha, y la fiesta: representaciones visuales y simbolismo de los ánades domésticos y silvestres entre los Moche. *Ñawpa Pacha*. 2017, vol. 37, nº 2, p. 111-131.
- GRIMAUD FRERES COMPANY, The muscovy duck is becoming more popular. *World Poultry-Misset*. 1989, vol. 3.
- GUO, S. & THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 1992, p. 361-372.
- HAIR, J.; ANDERSON, R.; BABIN, B. et al. *Multivariate data analysis: Pearson new international edition*. 7ma ed. Inglaterra: Pearson Education Limited. 2014. 734 p. ISBN 13: 978-1-292-02190-4.
- HALE, M.; BURG, T. & STEEVES, T. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS One*. 2012, vol. 7, nº 9, p. e45170.
- HAYDEN, M.; NGUYEN, T.; WATERMAN, A. et al. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*. 2008, vol. 9, nº 1, p. 80.
- HARTL, D. & CLARK, A. *Principles of Population Genetics*, 3ra ed. MA, EE.UU: Sinauer Assoc. Inc. 1997. 542 p.
- HARDY, O. J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H. et al. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*. 2003, vol. 163, nº 4, p. 1467-1482.
- HARVEY, M.; BONTER, D.; STENZLER, L. et al. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology*. 2006, vol. 77, nº 2, p. 136-140.

- HE, D.; DU, J.; LIU, Y. et al. Analysis on partial mitochondrial DNA D-loop sequences of Muscovy duck (*Cairina moschata*). *Acta Agric Shanghai*. 2008, vol. 24, nº 4, p. 1-4. (en chino).
- HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.; DLOUHY, S. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997, vol. 23, nº 3, p. 504-511.
- HERNANDEZ, D.; MUÑOZ, D.; VALENCIA, N. et al. Caracterización molecular del pato criollo colombiano en cuatro departamentos. *Acta Agronómica*. 2007, vol. 56, nº 3, p. 141-145.
- HOFFMANN, E. Muscovy duck. En KEAR J. (edit.) *Ducks, geese and swans: species accounts (Cairina to Mergus)* vol. 2. Oxford University Press. 2005, p 453-455.
- HOGAN, F.; COOKE, R.; BURRIDGE, C. et al. Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources*. 2008, vol. 8, nº 3, p. 561-567.
- HSIAO, M.; LIU, H.; HSU, Y. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in Tsaiya duck. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2008, vol. 21, nº 5, p. 624-627.
- HUANG, Y.; ZHAO, Y.; HALEY, C. et al. A genetic and cytogenetic map for the duck (*Anas platyrhynchos*). *Genetics*, 2006. vol. 173, nº 1, p. 287-296.
- HUANG, Y.; TU, J.; CHENG, X. et al. Characterization of 35 novel microsatellite DNA markers from the duck (*Anas platyrhynchos*) genome and cross-amplification in other birds. *Genetics Selection Evolution*. 2005, vol. 37, nº 5, p. 455.
- INIA, Instituto Nacional de Investigación Agraria -. *Primer Informe Nacional Sobre La Situación De Los Recursos Zoogenéticos*. 2004. Disponible en <<http://repositorio.inia.gob.pe/handle/inia/320>>
- JOHNSGARD, P. *Ducks, geese, and swans of the world*. Electronic Edition. NE, EE.UU: University of Nebraska-Lincoln Libraries. 2010. 404 p.
- JOHNSON, R. & WICHERN, D. Principal components. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. 1998, vol. 6, p. 430-481.

- JOMBART, T. & COLLINS, C. *A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.2*. Londres, Inglaterra: Imperial College London. 2016, p. 1-43.
- JOMBART, T.; DEVILLARD, S. & BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*. 2010, vol 11, nº 1, p. 1-15.
- JOMBART, T.; PONTIER, D. & DUFOUR, A. Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity*, 2009. vol. 102, nº 4, p. 330.
- KALIA, R. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 2011, vol. 177, no 3, p. 309-334
- KALINOWSKI, S.; TAPER, M. & MARSHALL, T. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007, vol. 16, nº 5, p. 1099-1106.
- KAEUFFER, R.; RÉALE, D.; COLTMAN, D. et al. Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity*. 2007, vol. 99, nº 4, p. 374.
- KHATIB, H. & GRUENBAUM, Y. Chicken red blood cells as a substrate for direct polymerase chain reaction. *Animal Genetics*, 1996, vol. 27, no 1, p. 53-54.
- KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Molecular Biology and Evolution*. 1983, vol. 1, nº 1, p. 84-93.
- KLUG, W.; CUMMINGS, M. & SPENCER, C. *Conceptos de Genética*. Traductores: José Luis Ménsua y David Bueno Torrens. 8va. ed. Madrid, España: Editorial Pearson Educación S.A. 2005. 883 p. (Traducido de *Concepts of Genetics 8th Edition*). ISBN 13: 978-84-205-5014-5
- KOCHER, T.; THOMAS, W.; MEYER, A. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, vol. 86, nº 16, p. 6196-6200.

- KOPELMAN, N.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M. et al. CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*. 2015, vol. 15, n° 5, p. 1179-1191.
- LEE, J.; TAN, C. & CHIA, K. A practical guide for multivariate analysis of dichotomous outcomes. *Ann Acad Med Singapore*. 2009, vol. 38, n° 8, p. 714-719.
- LI, Y. & LIU, J. StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*. 2018, vol. 18, n° 1, p. 176-177.
- LISCHER, H. & EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*. 2012, vol. 28, n° 2, p. 298-299.
- LIVEZEY, B. A phylogenetic analysis of recent anseriform genera using morphological characters. *The Auk*. 1986, vol. 103, n° 4, p. 737-754.
- LONDOÑO, J. "Estructura poblacional y diversidad genética de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes". Trabajo de Grado, Universidad Del Quindío. Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Colombia. 2011.
- LÓPEZ-ZAVALA, R.; CANO-CAMACHO, H.; CHASSIN-NORIA, O. et al. Diversidad genética y estructura de poblaciones de pavos domésticos mexicanos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2013, vol. 4, n° 4, p. 417-434.
- MAAK, S.; WIMMERS, K.; WEIGEND, S. et al. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes*. 2003, vol. 3, n° 2, p. 224-227.
- MAAK, S.; NEUMANN, K.; Lengerken, G. et al. First seven microsatellites developed for the Peking Duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics*. 2000, vol. 31, n° 3.
- MADGE, S. & BURN, H. *Waterfowl: an identification guide to the ducks, geese, and swans of the world*. MA, EE.UU: Editorial Boston: Houghton Mifflin, 1988.

- MARIE-ETANCELIN, C.; CHAPUIS, H., BRUN, J. et al. Genetics and selection of mule ducks in France: a review. *World's Poultry Science Journal*. 2008, vol. 64, n° 2, p. 187-208.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N. & MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2002, vol. 16, no 1, p. 47-51.
- MARTIN, K. The role of animal behavior studies in wildlife science and management. *Wildlife Society Bulletin*. 1998, vol. 26, n° 4, p. 911-920.
- MCVEAN, G.; MYERS, S.; HUNT, S. et al. The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome. *Science*. 2004, vol. 304, n° 5670, p. 581-584.
- MEIRMANS, P. AMOVA-based clustering of population genetic data. *Journal of Heredity*. 2012, vol. 103, n° 5, p. 744-750.
- MEIRMANS, P. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 2006, vol. 60, no 11, p. 2399-2402.
- MICHALAKIS, Y. & EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 1996, vol. 142, n° 3, p. 1061-1064.
- MILLER, M.; PFEIFFER, W. & SCHWARTZ, T. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. En *Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery*. ACM. 2011. p. 41.
- MORIN, P. & MCCARTHY, M. Highly accurate SNP genotyping from historical and low-quality samples. *Molecular Ecology Notes*. 2007, vol. 7, n° 6, p. 937-946.
- MUELLER, J. Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Briefings in Bioinformatics*. 2004, vol. 5, n° 4, p. 355-364.
- MULLIS, K. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. En *Annales de Biologie Clinique*. 1990. p. 579-582.
- NARVAIZA I. *Aumente la producción del pato real, manual*. FODECI. Puerto Ayacucho. Venezuela. 2008.

- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. 1ra ed. NY, EE. UU: Columbia University Press, 1987, 512 p. ISBN: 0231063210.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973, vol. 70, nº 12, p. 3321-3323.
- OBLESSUC, P.; CAMPOS, T.; CARDOSO, J. et al. Adaptation of fluorescent technique for genotyping with new microsatellite markers in common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2009, vol. 44, nº 6, p. 638-644.
- OETTING, W.; LEE, H.; FLANDERS, D. et al. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics*. 1995, vol. 30, nº 3, p. 450-458.
- OLIVEIRA, E.; PÁDUA, J.; ZUCCHI, M. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 2006, vol. 29, nº 2, p. 294-307.
- PARAMASIVAM, K; VYSHNAVA, S.; KANDERI, D. et al. Genetic diversity of Muscovy ducks revealed by mtDNA d-loop. *IOSR J. Biotechnol. Biochem*. 2017, vol. 3, p. 11-18.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 2012, vol. 28, nº 19, p. 2537-2539.
- PEMBERTON, J.; SLATE, J.; BANCROFT, D. et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*. 1995, vol. 4, nº 2, p. 249-252.
- PÉREZ, M. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. En *III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular. A Coruña. España*. 1996. p. 247-266.
- PIERCE, B. *Genética: Un enfoque conceptual*. Traducción: Editorial Médica Panamericana, 3ra ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A. 2009. 829 p. (Traducido de *Genetics: A Conceptual Approach 3th Edition*).

- PRIMMER, C. & ELLEGREN, H. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*. 1998, vol. 15, n° 8, p. 997-1008.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000, vol. 155, n° 2, p. 945-959.
- PROVAN, J.; SORANZO, N.; WILSON, N. et al. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics*. 1999, vol. 153, n° 2, p. 943-947.
- ROUSSET, F. GENEPOP-007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008, vol. 8, n° 1, p. 103-106.
- ROUSSET, F. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*. 1996, vol. 142, n° 4, p. 1357-1362.
- ROWE, K.; SINGHAL, S.; MACMANES, M. et al. Museum genomics: low-cost and high-accuracy genetic data from historical specimens. *Molecular Ecology Resources*. 2011, vol. 11, n° 6, p. 1082-1092.
- RUDNICK, J.; KATZNER, T. & DEWOODY, J. Genetic analyses of noninvasively collected feathers can provide new insights into avian demography and behavior. En *Handbook of Nature Conservation*. Nova Science Publishers, New York, 2009, p. 181-197
- SANTOS, F.; PENA, S. & EPPLER, J. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Human genetics*, 1993, vol. 90, no 6, p. 655-656.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 2000, vol. 18, n° 2, p. 233.
- SCHULENBERG, T.; STOTZ, D. & RICO, L. Distribution maps of the birds of Peru, version 1.0. *Environment, Culture & Conservation (ECCo)*, The Field Museum. 2006.

- SCHWENGEL, D.; JEDLICKA, A.; NANTHAKUMAR, E. et al. Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics*. 1994, vol. 22, n° 1, p. 46-54.
- SHERIFF, O. & ALEMAYEHU, K. Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2018, vol. 4, n° 1.
- SLATKIN, M. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*. 2008, vol. 9, n° 6, p. 477.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 1995, vol. 139, n° 1, p. 457-462.
- SMITH, T. B.; MARRA, P.; WEBSTER, M. et al. A call for feather sampling. *The Auk*. 2003, vol. 120, n° 1, p. 218-221.
- STAI, S. & HUGHES, C. Characterization of microsatellite loci in wild and domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Animal Genetics*. 2003, vol. 34, n° 5, p. 387-389.
- SU, Y. & CHEN, G. DNA microsatellite analysis of genetic diversity among Chinese indigenous laying-type ducks (*Anas platyrhynchos*). *Czech J. Anim. Sci.* 2009, vol. 54, n° 3, p. 128-135.
- SU, Y.; LONG, R.; CHEN, G. et al. Genetic analysis of six endangered local duck populations in China based on microsatellite markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, vol. 34, n° 11, p. 1010-1018.
- SUN, J.; HUANG, J.; ZHAO, X. et al. Limited genetic diversity of Chinese Muscovy Duck (*Cairina moschata*) revealed by partial sequences of mitochondrial DNA cytochrome b Gene. En *Information Technology and Agricultural Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012, p. 279-282.
- SUTTON, J.; ROBERTSON, B. & JAMIESON, I. Dye shift: a neglected source of genotyping error in molecular ecology. *Molecular Ecology Resources*. 2011, vol. 11, n° 3, p. 514-520.

- TABERLET, P. & BOUVET, J. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk*. 1991, vol. 108, nº 4, p. 959-960.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 1984, vol. 12, nº 10, p. 4127-4138.
- THOMAS, W.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. et al. Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *Journal of Molecular Evolution*. 1990, vol. 31, nº 2, p. 101-112.
- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z. & JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 2000, vol. 10, nº 7, p. 967-981.
- TORO, M.; FERNÁNDEZ, J.; SHAAT, I. et al. Assessing the genetic diversity in small farm animal populations. *Animal*. 2011, vol. 5, nº 11, p. 1669-1683.
- URQUHART, A. KIMPTON, C.; DOWNES, T. et al. Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of Legal Medicine*. 1994, vol. 107, nº 1, p. 13-20.
- VALLEJO, A. “Impacto de diferentes sistemas de manejos en la estructura genético poblacional de *Vicugna vicugna*”. Tesis para optar grado de Magister en Ciencias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Escuela de Postgrado. Especialidad de Producción Animal, Lima, Perú. 2008.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.; WILLS, D. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004, vol. 4, nº 3, p. 535-538.
- VIGILANT, L.; PENNINGTON, R.; HARPENDING, H. et al. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989, vol. 86, nº 23, p. 9350-9354.

- WALSH, P.; FILDES, N. & REYNOLDS, R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research*. 1996, vol. 24, nº 14, p. 2807-2812.
- WANG, M.; BARKLEY, N. & JENKINS, T. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics*. 2009, vol. 3, nº 1, p. 54-67.
- WAPLES, R. & GAGGIOTTI, O. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*. 2006, vol. 15, nº 6, p. 1419-1439.
- WATTIER, R.; ENGEL, C.; SAUMITOU-LAPRADE, P. et al. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracillaria gracillis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*. 1998, vol 7, no 11, p. 1569-1573.
- WEBER, J. L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 1990, vol. 1, nº 2, p. 166-171.
- WEIGEND, S. & ROMANOV, M. N. Current strategies for the assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. *World's Poultry Science Journal*. 2001, vol. 57, nº 3, p. 275-288.
- WEISSENBAACH, J. & DIB, G. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*. 1992, vol. 359, nº 6398, p. 794.
- WHATLEY, H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. En *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. NJ, EE.UU: Humana Press. 2001. p. 21-58.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics*. 1950, vol 15, nº 1, p. 323-354.

- WU, F.; HUANG, Y.; MA, S. et al. Evaluation of genetic diversity and relationships within and between two breeds of duck based on microsatellite markers. *Progress in Natural Science*. 2009, vol. 19, n° 11, p. 1581-1586.
- ZANE, L; BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 2002, vol. 11, n° 1, p. 1-16.
- ZHAO, X.; DUAN, X. J.; YANG, T. G. et al. Analysis of genetic variation in duck breeds using microsatellite markers. *Journal-Yangzhou University Agricultural and Life Sciences Edition*. 2005, vol. 26, n° 4, p. 34.

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 17. Datos pasaporte de los 155 individuos de la especie *Cairina moschata* muestreados.

Nº	COD. MUESTRA	SEXO	COLOR	DPTO COLECTA	PROVINCIA	DISTRITO	COORDENADAS DE COLECTA(UTM)	ALTURA (msnm)
1	CM-434	M	BLANCO	PIURA	PIURA	CASTILLA	17M 564756-9431069	225
2	CM-435	H	BLANCO/NEGRO	PIURA	PIURA	CASTILLA	17M 564756-9431069	225
3	CM-436	M	BLANCO	PIURA	PIURA	CASTILLA	17M 564756-9431069	225
4	CM-437	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591227-9430101	123
5	CM-438	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591264-9430134	142
6	CM-439	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591264-9430134	142
7	CM-440	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591237-9430199	123
8	CM-441	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591237-9430199	123
9	CM-442	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591237-9430199	123
10	CM-443	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591237-9430199	123
11	CM-444	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591240-9430381	118
12	CM-445	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591240-9430381	118
13	CM-446	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591240-9430381	118
14	CM-447	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 591240-9430381	118
15	CM-448	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590323-9428130	126
16	CM-449	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590323-9428130	126
17	CM-450	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590323-9428130	126
18	CM-451	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590323-9428130	126
19	CM-452	M	NEGRO/PLOMO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 589817-9424244	139

20	CM-453	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 589817-9424244	139
21	CM-454	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 589817-9424244	139
22	CM-455	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 589817-9424244	139
23	CM-456	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
24	CM-457	H	NEGRO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
25	CM-458	H	NEGRO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
26	CM-459	H	MARRÓN	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
27	CM-460	M	PLOMO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
28	CM-461	M	PLOMO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
29	CM-462	M	NEGRO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
30	CM-463	H	MARRÓN	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
31	CM-464	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
32	CM-465	M	NEGRO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
33	CM-466	H	MARRÓN	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590304-9428188	126
34	CM-467	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590773-9429215	121
35	CM-468	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590773-9429215	121
36	CM-469	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590773-9429215	121
37	CM-470	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590773-9429215	121
38	CM-472	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590443-9428418	131
39	CM-473	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	CHULUCANAS	17M 590443-9428418	131
40	CM-474	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 599949-9423179	132
41	CM-475	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 599949-9423179	132
42	CM-476	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 599949-9423179	132

43	CM-477	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 599949-9423179	132
44	CM-478	M	BLANCO/NEGRO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600602-9423553	128
45	CM-479	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600602-9423553	128
46	CM-480	H	BLANCO/MARRÓN	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600602-9423553	128
47	CM-481	M	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600602-9423553	128
48	CM-482	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600602-9423553	128
49	CM-483	H	BLANCO	PIURA	MORROPON	LA MATANZA	17M 600611-9423581	129
50	CM-484	H	PARDO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	128
51	CM-485	H	CENIZO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	128
52	CM-486	M	BLANCO/CENIZO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	128
53	CM-487	H	CENIZO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	93
54	CM-488	M	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	93
55	CM-489	M	NEGRO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545685-9453696	93
56	CM-490	H	BLANCO/PLOMO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 546060-9452787	76
57	CM-491	M	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 546060-9452787	76
58	CM-492	H	NEGRO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 546060-9452787	76
59	CM-493	H	BLANCO/NEGRO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 546060-9452787	76
60	CM-494	H	MARRÓN/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545916-9452815	81
61	CM-495	H	CENIZO CLARO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545916-9452815	81
62	CM-496	M	BLANCO/PLOMO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545916-9452815	81
63	CM-497	M	BLANCO/MARRÓN	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545916-9452815	81
64	CM-498	H	MARRÓN	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 545916-9452815	81
65	CM-499	H	PLOMO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 549763-9454298	90

66	CM-500	M	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 549763-9454298	90
67	CM-501	M	BLANCO/PLOMO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 549763-9454298	90
68	CM-502	H	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 549763-9454298	90
69	CM-503	M	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 549763-9454298	90
70	CM-504	M	BLANCO/CENIZO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 574568-9459390	96
71	CM-505	H	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 574568-9459390	96
72	CM-506	H	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 574568-9459390	96
73	CM-507	M	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 575871-9462566	105
74	CM-508	H	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 575871-9462566	105
75	CM-509	H	CENIZO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 575871-9462566	105
76	CM-510	H	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 575871-9462566	105
77	CM-511	H	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 575871-9462566	105
78	CM-512	H	BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 576072-9462788	103
79	CM-513	M	MARRÓN/PARDO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 576072-9462788	103
80	CM-514	H	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 576072-9462788	103
81	CM-515	M	NEGRO/BLANCO	PIURA	PIURA	TAMBO GRANDE	17M 576072-9462788	103
82	CM-555	H	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782168-9408078	399
83	CM-558	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782168-9408078	399
84	CM-559	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782168-9408078	354
85	CM-561		NEGRO/BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782168-9408078	354
86	CM-563	M	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782242-9408662	355
87	CM-564	H	NEGRO/BLANCA	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782242-9408662	355
88	CM-565	H	MARRÓN/BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782242-9408662	355

89	CM-566		BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782242-9408662	355
90	CM-568	H	MARRÓN	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782182-9408673	358
91	CM-569	H	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782182-9408673	358
92	CM-570	M	BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782182-9408673	358
93	CM-571	H	BLANCO/NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782182-9408673	358
94	CM-572	H	BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	ARAMANGO	17M 782096-9409041	368
95	CM-574	M	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	IMAZA	17M 810036-9457695	263
96	CM-576	M	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	IMAZA	17M 810036-9457695	263
97	CM-577	M	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 167668-9483194	218
98	CM-578	H	NEGRO/BLANCO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 167668-9483194	218
99	CM-579	H	NEGRO ALA VERDE	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
100	CM-580	H	NEGRO/BLANCA	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
101	CM-581	M	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
102	CM-582	H	NEGRO/BLANCA	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
103	CM-583	H	BLANCO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
104	CM-584	M	NEGRO ALA VERDE	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171872-9487338	208
105	CM-585	H	MARRÓN	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 171971-9487354	210
106	CM-587	M	CENIZO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181722-9490850	193
107	CM-588	H	BLANCO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181722-9490850	193
108	CM-589	H	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181722-9490850	193
109	CM-590	M	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181722-9490850	193
110	CM-591	H	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181722-9490850	193
111	CM-593	H	NEGRO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181724-9490882	200

112	CM-594	H	MORO/PLOMO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181408-9490788	214
113	CM-595	M	NEGRO ALA VERDE	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181466-9490833	208
114	CM-596	H	BLANCO	AMAZONAS	CONDORCANQUI	NIEVA	18M 181410-9490659	207
115	CM-597	H	PLOMO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778077-9372710	472
116	CM-598	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778077-9372710	472
117	CM-599	H	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778077-9372710	472
118	CM-602	H	BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778072-9372739	471
119	CM-603	M	NEGRO/BLANCO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778072-9372739	471
120	CM-604	M	CENIZO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778072-9372739	471
121	CM-605	H	CENIZO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778072-9372739	471
122	CM-606	M	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778271-9372568	474
123	CM-608	H	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778271-9372568	474
124	CM-609	H	NEGRO	AMAZONAS	BAGUA	BAGUA	17M 778271-9372568	474
125	CM-610	M	PLOMO/BLANCO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204163-9311982	2428
126	CM-611	H	NEGRO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204519-9312073	2410
127	CM-612	H	MARRÓN	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204519-9312073	2410
128	CM-613	M	PLOMO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204519-9312073	2410
129	CM-614	H	NEGRO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204519-9312073	2410
130	CM-615	M	PLOMO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 204519-9312073	2410
131	CM-616	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 210540-9310860	2471
132	CM-617	H	NEGRO	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 210540-9310860	2471
133	CM-618	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 210540-9310860	2471
134	CM-619	H	NEGRO/ BLANCA	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	MOLINOPAMPA	18M 210540-9310860	2471

135	CM-620	H	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	MARISCAL BENAVIDES	18M 221697-9294751	1614
136	CM-621	M	NEGRO/ BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	MARISCAL BENAVIDES	18M 221697-9294751	1614
137	CM-622	M	NEGRO/ BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	MARISCAL BENAVIDES	18M 221732-9294775	1619
138	CM-623	H	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	MARISCAL BENAVIDES	18M 221732-9294775	1619
139	CM-625	M	NEGRO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	MARISCAL BENAVIDES	18M 221732-9294775	1619
140	CM-626	H	NEGRO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 224985-9292367	1596
141	CM-627	M	NEGRO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 224985-9292367	1596
142	CM-628	H	NEGRO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 224985-9292367	1596
143	CM-629	H	MARRÓN	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 224985-9292367	1596
144	CM-630	H	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 224985-9292367	1596
145	CM-631	H	MARRÓN ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 223934-9291246	1591
146	CM-632	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 223934-9291246	1591
147	CM-633	H	MARRÓN ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 223934-9291246	1591
148	CM-635	M	NEGRO ALA BLANCA	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 223721-9291013	1606
149	CM-636	H	BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 223721-9291013	1606
150	CM-637	H	BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226388-9292500	1633
151	CM-638	H	BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226388-9292500	1633
152	CM-639	M	MARRÓN/PARDO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226388-9292500	1633
153	CM-640	M	NEGRO/BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226388-9292500	1633
154	CM-641	H	NEGRO/BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226343-9292383	1619
155	CM-642	M	BLANCO	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	SAN NICOLAS	18M 226343-9292383	1619

Anexo 2.

Protocolo de extracción de ADN genómico a partir de plumas cobertoras alares de *Cairina moschata* (Fuente: Taberlet y Bouvet, 1991; Bello et al., 2001).

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE PLUMAS

DÍA 1

1. Encender el termobloque y regular a una temperatura de 55°C
2. En un tubo de microcentrifuga (2 mL) adicionar aproximadamente 5 plumas, cortando transversalmente porciones de entre 1 y 2 cm del cálamo.
3. Adicionar 750 µL de TE20:5 y 75 µL de SDS 10%
4. Adicionar 15 µL de Proteinasa K (20 ng/µL)
5. Incubar a 55°C por 3 horas (observar cada 30', hasta que se degraden las plumas)
6. Retirar los tubos del termobloque y enfriar (10 minutos aproximadamente)
7. Adicionar 500 µL de acetato de potasio 3M, agitar con vortex y refrigerar por 10' a -20°C
8. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos, 10°C y recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga de 2 mL
9. Enraizar con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), homogenizar en vortex por 1 minuto.
10. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 10°C el tubo anterior (con el sobrenadante recuperado) y recuperar el sobrenadante en 2 tubos (por duplicado para cada muestra) de 2 mL, que contenga 800 µL de isopropanol helado.
11. Homogenizar suavemente por inversión para la formación del pellet de ADN. Refrigerar por 15' a -20°C
12. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos, 10°C y eliminar el sobrenadante
13. Adicionar 200 µL de TE20:5 (dejar a 4°C), 200 µL de acetato y 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), homogenizar con vortex por 1 minuto
14. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos y recuperar el sobrenadante de las muestras por duplicado en un solo tubo de microcentrifuga
15. Adicionar 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), vortex 1 min.
16. Centrifugar por 10' a 14000 rpm a 10°C, trasvasar el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga de 1.5 mL (tubos definitivos)
17. Adicionar aproximadamente 800 µL de etanol absoluto (enraizar a 1.5 mL), invertir suavemente hasta visualizar el algodón de ADN y refrigerar a -20°C durante 30'
18. Centrifugar por 5' a 14000 rpm a 10°C y eliminar el sobrenadante por inversión. Cuidado de no botar el pellet.
19. Adicionar 200 µL de TE20:5 (dejar a 4°C) y mezclar.

DIA 2

20. Adicionar 8 µL NaCl 5M. Mezclar utilizando vortex.
21. Adicional etanol absoluto helado 500 µL, mezclar invirtiendo el tubo suavemente hasta que se formen los pellets de ADN, dejar a -20°C por 20 minutos.
22. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar el sobrenadante.
23. Adicionar 400 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar sobrenadante por inversión.
24. Adicionar 400 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar sobrenadante por inversión.
25. Adicionar 300 µL de etanol al 70% (helado). Mezclar suavemente. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar sobrenadante por inversión.
26. Adicionar 400 µL de etanol absoluto helado. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar sobrenadante por inversión.
27. Adicionar 200 µL de etanol absoluto helado. Mezclar suavemente. Observar el tamaño del pellet de ADN y de acuerdo a ello se asigna TE10:1 en diferentes cantidades. Centrifugar 5' a 14000 rpm a 10°C, eliminar sobrenadante por inversión.
28. Dejar secar a temperatura ambiente por 1 día o en la estufa a 39°C (O/N)
29. Resuspender en buffer TE10:1 de acuerdo al tamaño del pellet de ADN.
30. Almacenar a -20°C

Anexo 3.

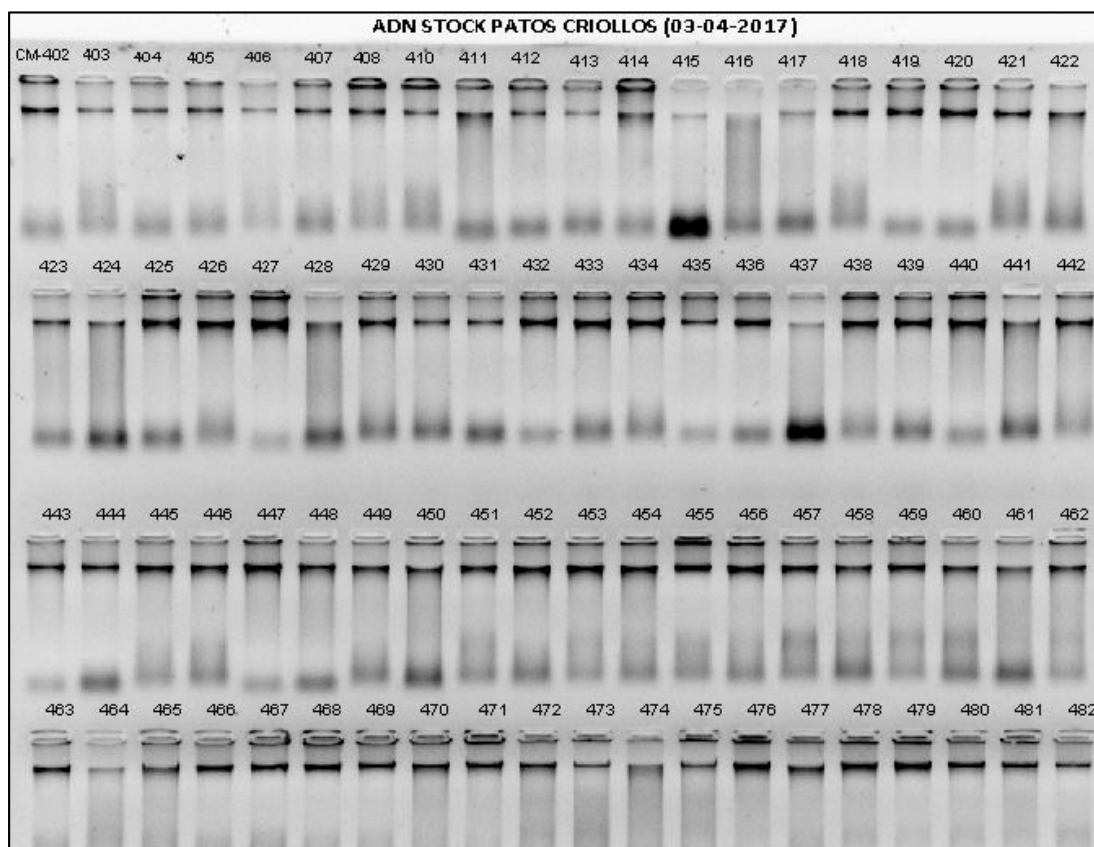


Figura 34. Geles de agarosa al 1% del ADN total de *Cairina moschata*.

Anexo 4.

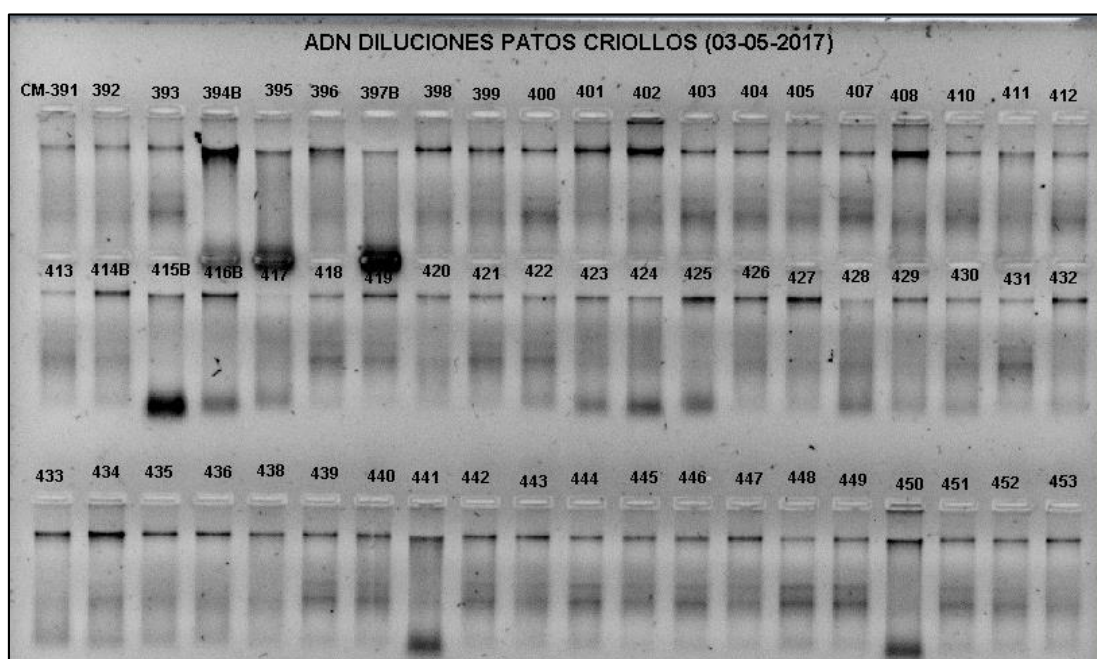


Figura 35. Geles de agarosa al 2% de las diluciones de ADN (30 ng/μL) de *Cairina moschata*.

Anexo 5.

Tabla 18. Información sobre los 29 marcadores elegidos para el análisis de diversidad genética de *Cairina moschata*.

Nº	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORO-FORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
1	APL580	APL580F: CACGACGTTGTAAAACGACGGATGTTGCCCCACATATTT	104-170	6-FAM	**	Zhao et al., 2005; Su et al., 2007.
		APL580R: TTGCCTTGTATGAGCCATTA				
2	CmAAT16	CmAAT16F: CACGACGTTGTAAAACGACCTCCAAGGGTACCAGTGAA	180-235	6-FAM	(AAT)10	Stai y Hughes, 2003.
		CmAAT16R: TGTTGGCTCCCTGCTTAAA				
3	CmAAT35	CmAAT35F: CACGACGTTGTAAAACGACTCCAGGTCACGTAGTTTTTAAGTA	238-305	6-FAM	(AAT)9	Stai y Hughes, 2003.
		CmAAT35R: GACCTAAGGCCAACCTATATC				
4	APL2	APL2F: CACGACGTTGTAAAACGACGATTCAACCTTAGCTATCAGTCTCC	90-128	6-FAM	(CA)15GA(CA)32 AAA(CAA)4	Denk et al., 2004.
		APL2R: CGCTCTTGGCAAATGTCC				
5	CAUD026	CAUD026F: CACGACGTTGTAAAACGACACGTCACATCACCACACAG	138-168	6-FAM	(AC)17	Huang et al., 2005.
		CAUD026R: CTTTGCCTCTGGTGAGGTTT				
6	CADU86	CADU86F: CACGACGTTGTAAAACGACGCAGAGCGGTGTGAGAGCA	176-216	6-FAM	**	Su et al., 2007.
		CADU86R: AACACAGCTTACCCACACAG				
7	AY295	AY295F: CACGACGTTGTAAAACGACGGCTTCTGTGCTCCTCAGAT	231-403	6-FAM	(TCTCTTTC)9 ... (TTTC) 12	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
		AY295R: GCACAAGTGGCATGTGTCAT				
8	APL36	APL36F: CACGACGTTGTAAAACGACATGCTTTGCTGTTGGAGAGC	100-135	NED	(CA)13GA(CA)3(GA)2 (CA)2GA(CA)10GA	Denk et al., 2004.
		APL36R: TCCACTGGGTGCAAACAAG				
9	CmAAT38	CmAAT38F: CACGACGTTGTAAAACGACTCCCGAGCTACCACATTGAC	140-209	NED	(AAT)16	Stai y Hughes, 2003.
		CmAAT38R: AGCAACTGGAAGGCATTTATC				
10	CAUD001	CAUD001F: CACGACGTTGTAAAACGACACAGCTTCAGCAGACTTAGA	290-330	NED	(AAAAC)3A6G(CA)9 A33	Huang et al., 2005.
		CAUD001R: GCAGAAAAGTGATTAAGGAAG				

Nº	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORO-FORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
11	AY285	AY285F: CACGACGTTGTAAAACGACT CCACCCCAAACCCTGC	350-490	NED	(CTTT)19T10	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
		AY285R: TGTGTAACCCGATAGACTGA				
12	APL11	APL11F: CACGACGTTGTAAAACGACA ACTACAGGGCACCTTATTTCC	70-127	NED	(GA)25	Denk et al., 2004.
		APL11R: TTGCATCAGGGTCTGTATTTTC				
13	CAUD022	CAUD022F: CACGACGTTGTAAAACGAC CATGCTGAGTGCCTATCCT	132-168	NED	(CGA)8	Huang et al., 2005.
		CAUD022R: CCAGGTCAGGCGTGTGCT				
14	APT004	APT004F: CACGACGTTGTAAAACGAC GCGGCAGGAAAATCTCCTGAAT	292-352	NED	GATAGAT(GATA)15	Hsiao et al., 2008.
		APT004R: TCTCAGTGGCTGAGCGGTC				
15	CMO211	CMO211F: CACGACGTTGTAAAACGAC GCGATGTTGCCCCACATATTT	90-130	VIC	**	Zhao et al., 2005; Su et al., 2007.
		CMO211R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATT				
16	APT025	APT025F: CACGACGTTGTAAAACGAC TCCTAAGAAACGTTGCTTCATAGACC	130-172	VIC	(GATA)13	Hsiao et al., 2008.
		APT025R: GAGTTAAGCTTCATCACTCTGTGACTG				
17	APH13	APH13F: CACGACGTTGTAAAACGAC CAACGAGTGACAATGATAAA	173-220	VIC	(GA)10	Maak et al., 2003.
		APH13R: CAATGATCTCACTCCCAATAG				
18	APH18	APH18F: CACGACGTTGTAAAACGAC TTCTGGCCTGATAGGTATGAG	225-300	VIC	(CA)8	Maak et al., 2003.
		APH18R: GAATTGGGTGGTTCATACTGT				
19	CADU24	CADU24F: CACGACGTTGTAAAACGAC CCAGCCAAGAACCTCCAGT	124-178	PET	**	Su et al., 2007.
		CADU24R: CTTTGAATGTCCATGTAGCAG				
20	AY294	AY294F: CACGACGTTGTAAAACGAC TGTAGTTTAGTTGCTGGATA	200-360	PET	(TTTC)8TTCC(TTTC)17	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
		AY294R: TTAGTAAACTCTTGCCATCT				
21	APT021	APT021F: CACGACGTTGTAAAACGAC GCACTCCCTAACTAGTAGCGCTCT	161-193	PET	(GATA)10	Hsiao et al., 2008.
		APT021R: GAAGCATTGTCATACTTGCCCTGA				

Nº	LOCUS	SECUENCIA	RANGO	FLUORO-FORO	MOTIVO DE REPETICIÓN	REFERENCIA
22	APT029	APT029F: CACGACGTTGTAAAACGACT CTGCAAGGTATTCTCATTCTTATTCTT	169-215	PET	(GATA)14	Hsiao et al., 2008.
		APT029R: GATACGTAGAGTGGATGCTGGAGAT				
23	APH07	APH07F: CACGACGTTGTAAAACGAC ACATCTTTGGCATTGAA	220-320	PET	(GGAA)18	Maak et al., 2000; Baratti et al., 2009; Ahmadi et al., 2007.
		APH07R: CATCCACTAGAACACAGACATT				
24	CmAAT28*	CmAAT28 F: CACGACGTTGTAAAACGACT GAAAAGGGTCTTTACCTTATAT	*	*	(AAT)23	Stai y Hughes, 2003.
		CmAAT28 R: TTCCACATAAAAATTCATTCAG				
25	APH09*	APH09F: CACGACGTTGTAAAACGAC GATGTTGCCCCACATATTT	*	*	(CA)11	Maak et al., 2000; Baratti et al., 2009; Ahmadi et al., 2007.
		APH09R: TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA				
26	APL14*	APL14F: CACGACGTTGTAAAACGAC CCTTTTCCAAGGGGCTACAC	*	*	(CA)6CG(CA)4TA (CA)4TA(CA)10	Denk et al., 2004.
		APL14R: CTCTTCCCCAAAACGTCATC				
27	CAUD019*	CAUD019F: CACGACGTTGTAAAACGAC CTTAGCCCAGTGAAGCATG	*	*	(TTTC)23	Huang et al., 2005.
		CAUD019R: GCAGACTTTTACTTATGACTC				
28	AY269*	AY269F: CACGACGTTGTAAAACGACT CGCATTAAAGCTCTGATCT	*	*	(TTTC)33T19	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
		AY269R: ATCAACAGAATCCAAAATATG				
29	AY283*	AY283F: CACGACGTTGTAAAACGAC GACCACAACATCGTGCAGAG	*	*	(TTTC)23CT19	Huang et al., 2006; Su et al., 2007.
		AY283R: GATAATGGCTGGCTCCTTGA				

(*) Locus con transferibilidad no exitosa, (**) Información que no se encuentra publicada.

Anexo 6.

Protocolos de amplificación mediante PCR múltiplex para 23 marcadores SSRs.

FAM-1		
PROTOCOLO: APL580, CmAAT16, CmAAT35		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.3 mM
MgCl ₂	25 mM	3 mM
CEBADOR F APL580	10 µM	0.15 µM
CEBADOR R APL580	10 µM	0.3 µM
CEBADOR F CmAAT16	10 µM	0.3 µM
CEBADOR R CmAAT16	10 µM	0.4 µM
CEBADOR F CmAAT35	10 µM	0.08 µM
CEBADOR R CmAAT35	10 µM	0.16 µM
Cola M13 FAM	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

FAM-2		
PROTOCOLO: APL02, CAUD26, CADU86, AY295		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	3 mM
CEBADOR F APL02	10 µM	0.03 µM
CEBADOR R APL02	10 µM	0.06 µM
CEBADOR F CAUD26	10 µM	0.08 µM
CEBADOR R CAUD26	10 µM	0.16 µM
CEBADOR F CADU86	10 µM	0.1 µM
CEBADOR R CADU86	10 µM	0.2 µM
CEBADOR F AY295	10 µM	0.1 µM
CEBADOR R AY295	10 µM	0.2 µM
Cola M13 FAM	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

NED-1		
PROTOCOLO: APL36, CAUD001, CmAAT38, AY285		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.25 mM
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM
CEBADOR F APL36	5 µM	0.025 µM
CEBADOR R APL36	5 µM	0.05 µM
CEBADOR F CAUD001	10 µM	0.22 µM
CEBADOR R CAUD001	10 µM	0.3 µM
CEBADOR F CmAAT38	10 µM	0.08 µM
CEBADOR R CmAAT38	10 µM	0.16 µM
CEBADOR F AY285	10 µM	0.3 µM
CEBADOR R AY285	10 µM	0.4 µM
Cola M13 NED	20 µM	0.3 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

NED-2		
PROTOCOLO: CAUD22, APL11, APT04		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	2 mM
CEBADOR F CAUD22	10 µM	0.3 µM
CEBADOR R CAUD22	10 µM	0.4 µM
CEBADOR F APL11	10 µM	0.05 µM
CEBADOR R APL11	10 µM	0.1 µM
CEBADOR F APT04	10 µM	0.1 µM
CEBADOR R APT04	10 µM	0.2 µM
Cola M13 PET	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

VIC		
PROTOCOLO: CMO211, APH13, APT25, APH18		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	3 mM
CEBADOR F CMO211	10 µM	0.25 µM
CEBADOR R CMO211	10 µM	0.3 µM
CEBADOR F APH13	10 µM	0.05 µM
CEBADOR R APH13	10 µM	0.1 µM
CEBADOR F APT25	10 µM	0.07 µM
CEBADOR R APT25	10 µM	0.15 µM
CEBADOR F APH18	10 µM	0.3 µM
CEBADOR R APH18	10 µM	0.4 µM
Cola M13 VIC	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

PET-1		
PROTOCOLO: CADU24, AY294		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.3 mM
MgCl ₂	25 mM	3 mM
CEBADOR F CADU24	5 µM	0.025 µM
CEBADOR R CADU24	5 µM	0.05 µM
CEBADOR F AY294	10 µM	0.15 µM
CEBADOR R AY294	10 µM	0.3 µM
Cola M13 PET	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

PET-2 PROTOCOLO: APT29, APH07, APT21		
	Con. Stock	Conc. Final
H ₂ O MQ		
BUFFER	5 X	1 X
dNTPs	2.5 mM	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	2 mM
CEBADOR F APT29	10 µM	0.2 µM
CEBADOR R APT29	10 µM	0.4 µM
CEBADOR F APH07	10 µM	0.05 µM
CEBADOR R APH07	10 µM	0.1 µM
CEBADOR F APT21	10 µM	0.05 µM
CEBADOR R APT21	10 µM	0.1 µM
Cola M13 PET	20 µM	0.2 µM
TAQ	5 U	0.5 U
ADN	30 ng/µL	
Vol. Master Mix		
Volumen total		10 µL

Anexo 7.

Programas de amplificación para los PCR múltiplex.

PROTOCOLO 1	FAM-1
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min
	30 ciclos: 95 °C x 45 seg; 57 °C x 1 min;
	72 °C x 1 min
	Extensión final: 72 °C x 10 min
	4 °C mantenimiento
	FAM-2
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min
	30 ciclos: 95 °C x 45 seg; 59°C x 1 min;
	72 °C x 1 min
	Extensión final: 72 °C x 10 min
	4 °C mantenimiento

PROTOCOLO 2	NED-1 & NED-2
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min 35 ciclos: 95 °C x 45 seg; 53 °C x 1 min; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 10 min 4 °C mantenimiento
	PET-1
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min 35 ciclos: 95 °C x 45 seg; 57 °C x 1 min; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 10 min 4 °C mantenimiento

PROTOCOLO 3	VIC & PET-2
	1 Ciclo: 95 °C x 5 min 25 ciclos: 95 °C x 45 seg; 57 °C x 1 min; 72 °C x 1 min 10 ciclos: 95 °C x 30 seg; 53 °C x 45 seg; 72 °C x 1 min Extensión final: 72 °C x 15 min 4 °C mantenimiento

Anexo 8.

Tabla 19. Registro de las frecuencias alélicas en los 23 marcadores SSRs en las poblaciones de Piura y Amazonas.

Nombre del locus	Nº total de alelos	PIURA			AMAZONAS		
		Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica	Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica
APL580	12	11	106	0.068	9	106	0.304
			110	0.056		110	0.061
			122	0.006		122	0.034
			126	0.093		126	0.041
			128	0.025		128	0.014
			138	0.006		132	0.007
			142	0.012		142	0.034
			144	0.685		144	0.480
			146	0.012		150	0.027
			150	0.031			
			154	0.006			
CmAAT16	8	8	184	0.258	8	184	0.167
			187	0.015		187	0.176
			190	0.015		190	0.074
			193	0.530		193	0.463
			211	0.008		211	0.009
			226	0.015		226	0.037
			229	0.068		229	0.009
CmAAT35	9	6	232	0.091	9	232	0.065
			247	0.769		241	0.014
			253	0.094		247	0.586
			271	0.013		253	0.129
			280	0.100		256	0.036
			295	0.006		259	0.007
			298	0.019		271	0.029
						280	0.100
APL36	1	1	127	1.000	1	295	0.014
						298	0.086
						127	1.000

Nombre del locus	Nº total de alelos	PIURA			Nº de alelos	AMAZONAS	
		Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica		Tamaño de alelos	Frecuencia alélica
CmAAT38	15	8	146	0.367	13	146	0.176
			149	0.038		152	0.021
			152	0.051		155	0.042
			179	0.177		164	0.014
			182	0.120		170	0.014
			188	0.209		173	0.014
			191	0.019		179	0.282
			200	0.019		182	0.042
						185	0.028
						188	0.268
						191	0.007
						194	0.063
						197	0.028
CAUD001	3	2	311	0.329	3	311	0.211
			313	0.671		313	0.754
						315	0.035
AY285	24	17	366	0.007	20	398	0.007
			406	0.027		402	0.007
			408	0.014		406	0.014
			420	0.027		410	0.007
			428	0.020		412	0.014
			432	0.061		418	0.021
			436	0.014		424	0.021
			440	0.041		428	0.035
			444	0.101		432	0.035
			448	0.135		436	0.069
			452	0.209		440	0.063
			456	0.115		444	0.090
			460	0.115		448	0.076
			464	0.027		452	0.160
			468	0.014		456	0.125
			472	0.068		460	0.069
			482	0.007		464	0.104
CADU24	5	4			4	468	0.028
						472	0.042
						476	0.014
			136	0.006		144	0.158
			144	0.136		146	0.808
			146	0.790		148	0.014
			148	0.068		150	0.021

Nombre del locus	Nº total de alelos	PIURA			AMAZONAS		
		Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica	Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica
AY294	28	21	215	0.025	24	215	0.042
			267	0.006		255	0.083
			271	0.006		259	0.007
			281	0.148		261	0.007
			285	0.185		263	0.035
			287	0.006		267	0.007
			289	0.148		275	0.007
			293	0.068		277	0.063
			297	0.056		281	0.125
			301	0.025		285	0.153
			305	0.012		287	0.028
			309	0.043		289	0.014
			313	0.025		293	0.049
			317	0.012		297	0.035
			321	0.006		301	0.007
			325	0.068		305	0.028
			327	0.012		309	0.056
			329	0.099		313	0.014
			333	0.025		321	0.028
			341	0.019		325	0.042
APL2	2	2	117	0.012	1	119	1.000
			119	0.988			
CAUD026	5	4	158	0.105	4	142	0.007
			160	0.012		158	0.047
			162	0.852		162	0.878
CADU86	4	4	164	0.031	3	164	0.068
			180	0.008		184	0.071
			184	0.048		192	0.153
			192	0.095		194	0.776
			194	0.849			

Nombre del locus	Nº total de alelos	PIURA			Nº de alelos	AMAZONAS	
		Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica		Tamaño de alelos	Frecuencia alélica
AY295	34	24	233	0.185	27	233	0.048
			259	0.235		259	0.240
			263	0.049		263	0.014
			271	0.012		271	0.007
			279	0.012		279	0.048
			281	0.019		283	0.034
			283	0.012		285	0.075
			285	0.025		287	0.048
			287	0.006		289	0.110
			289	0.074		291	0.062
			291	0.068		293	0.014
			293	0.117		295	0.014
			295	0.006		297	0.034
			297	0.056		301	0.021
			301	0.025		303	0.041
			307	0.012		305	0.062
			347	0.025		307	0.021
			349	0.012		309	0.007
			365	0.006		317	0.007
			369	0.019		335	0.034
371	0.006	343	0.007				
373	0.006	349	0.007				
375	0.006	375	0.014				
395	0.006	379	0.007				
				383	0.007		
				387	0.014		
				391	0.007		
APL11	2	1	110	1.000	2	100	0.014
						110	0.986
CAUD022	6	6	141	0.007	5	147	0.158
			147	0.150		150	0.317
			150	0.179		153	0.475
			153	0.629		156	0.033
			156	0.007		159	0.017
			159	0.029			
APT004	5	4	303	0.014	5	303	0.036
			307	0.789		307	0.659
			311	0.021		311	0.022
			315	0.176		315	0.246
						319	0.036

Nombre del locus	PIURA				AMAZONAS		
	Nº total de alelos	Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica	Nº de alelos	Tamaño de alelos	Frecuencia alélica
CMO211	6	4	108	0.629	6	108	0.558
			112	0.060		112	0.163
			124	0.293		120	0.023
			128	0.017		122	0.081
						124	0.140
						128	0.035
APT025	7	5	138	0.049	7	134	0.034
			142	0.333		138	0.115
			146	0.321		142	0.304
			150	0.241		146	0.324
			154	0.056		150	0.155
						154	0.061
APH13	4	4	185	0.420	4	185	0.257
			187	0.160		187	0.162
			189	0.377		189	0.473
			191	0.043		191	0.108
APH18	1	1	270	1.000	1	270	1.000
APT021	6	5	169	0.101	6	169	0.190
			173	0.051		173	0.026
			177	0.254		177	0.155
			181	0.471		181	0.457
			185	0.123		185	0.164
						189	0.009
APT029	8	8	171	0.076	8	171	0.029
			183	0.013		183	0.036
			187	0.234		187	0.250
			191	0.424		191	0.300
			195	0.139		195	0.300
			199	0.082		199	0.043
			203	0.019		203	0.029
			207	0.013		207	0.014
APH07	6	5	236	0.456	6	236	0.565
			256	0.038		244	0.029
			268	0.304		256	0.007
			280	0.133		268	0.254
			304	0.070		280	0.123
						304	0.022

Anexo 9.

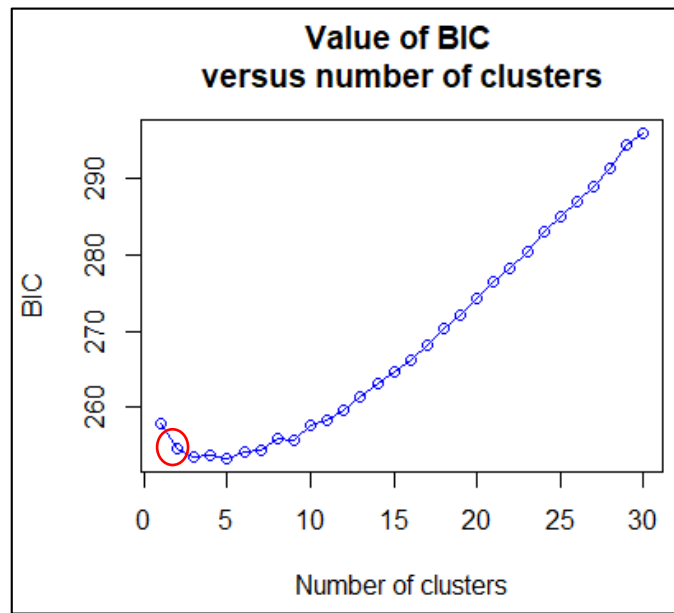


Figura 36. Análisis del valor de BIC para el agrupamiento por el método de k-medias utilizando la función *find.clusters*. Un valor de $K = 3$ (el menor valor del criterio de información bayesiano, BIC) representa el agrupamiento más óptimo de los datos.

Anexo 10.

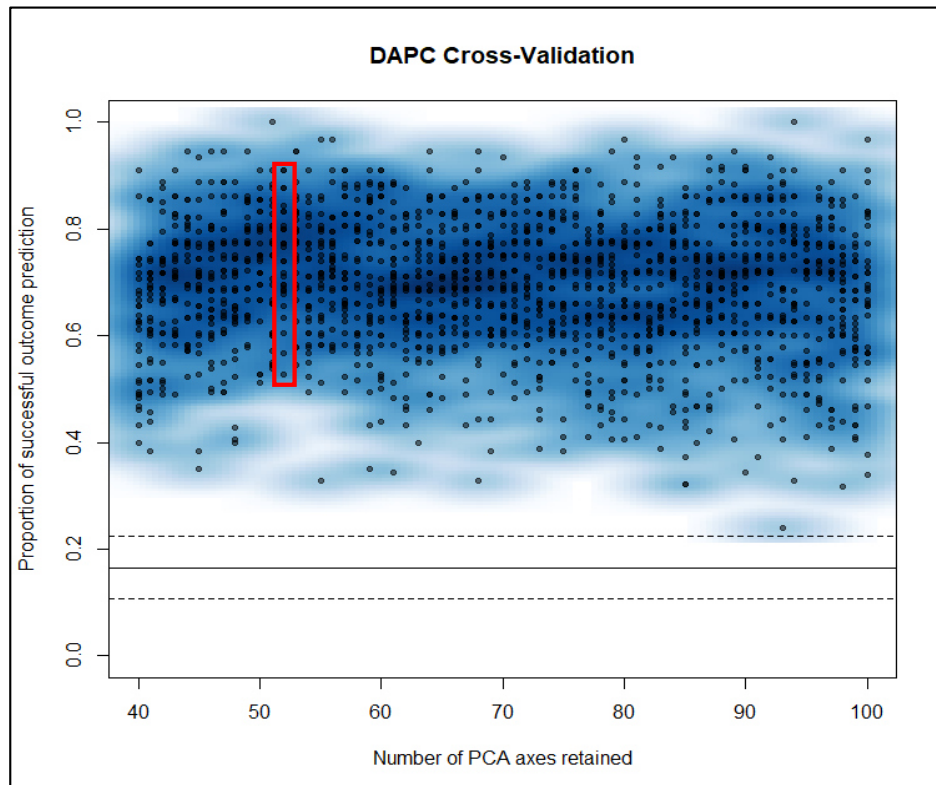


Figura 37. Gráfico de dispersión de la validación cruzada DAPC para identificar el número de componentes principales (PC) a retener, utilizando la función *xvalDapc*. La proporción de predicción de resultados exitosos muestra que cuando el número de PC retenidos es 52 se obtiene la mayor concentración de los replicados.

Anexo 11.

Tabla 20. Pertenencia de cada individuo a los grupos hallados por el DAPC. Los colores anaranjado, morado y celeste corresponden a los grupos K1, K2 y K3 respectivamente.

Nº	CODIGO INIA	DPTO	PROVINCIA	GRUPO ASIGNADO POR EL DAPC
1	CM-434	PIURA	PIURA	2
2	CM-435	PIURA	PIURA	2
3	CM-436	PIURA	PIURA	2
4	CM-437	PIURA	MORROPON	3
5	CM-438	PIURA	MORROPON	3
6	CM-439	PIURA	MORROPON	3
7	CM-440	PIURA	MORROPON	2
8	CM-441	PIURA	MORROPON	3
9	CM-442	PIURA	MORROPON	3
10	CM-443	PIURA	MORROPON	2
11	CM-444	PIURA	MORROPON	3
12	CM-445	PIURA	MORROPON	3
13	CM-446	PIURA	MORROPON	3
14	CM-447	PIURA	MORROPON	3
15	CM-448	PIURA	MORROPON	3
16	CM-449	PIURA	MORROPON	3
17	CM-450	PIURA	MORROPON	2
18	CM-451	PIURA	MORROPON	3
19	CM-452	PIURA	MORROPON	3
20	CM-453	PIURA	MORROPON	3
21	CM-454	PIURA	MORROPON	3
22	CM-455	PIURA	MORROPON	3
23	CM-456	PIURA	MORROPON	3
24	CM-457	PIURA	MORROPON	3
25	CM-458	PIURA	MORROPON	2
26	CM-459	PIURA	MORROPON	3
27	CM-460	PIURA	MORROPON	3
28	CM-461	PIURA	MORROPON	3
29	CM-462	PIURA	MORROPON	3
30	CM-463	PIURA	MORROPON	3
31	CM-464	PIURA	MORROPON	3
32	CM-465	PIURA	MORROPON	3
33	CM-466	PIURA	MORROPON	3
34	CM-467	PIURA	MORROPON	2
35	CM-468	PIURA	MORROPON	2
36	CM-469	PIURA	MORROPON	2

37	CM-470	PIURA	MORROPON	2
38	CM-472	PIURA	MORROPON	3
39	CM-473	PIURA	MORROPON	3
40	CM-474	PIURA	MORROPON	3
41	CM-475	PIURA	MORROPON	2
42	CM-476	PIURA	MORROPON	2
43	CM-477	PIURA	MORROPON	2
44	CM-478	PIURA	MORROPON	3
45	CM-479	PIURA	MORROPON	3
46	CM-480	PIURA	MORROPON	3
47	CM-481	PIURA	MORROPON	2
48	CM-482	PIURA	MORROPON	3
49	CM-483	PIURA	MORROPON	3
50	CM-484	PIURA	PIURA	2
51	CM-485	PIURA	PIURA	2
52	CM-486	PIURA	PIURA	2
53	CM-487	PIURA	PIURA	2
54	CM-488	PIURA	PIURA	3
55	CM-489	PIURA	PIURA	2
56	CM-490	PIURA	PIURA	2
57	CM-491	PIURA	PIURA	3
58	CM-492	PIURA	PIURA	3
59	CM-493	PIURA	PIURA	2
60	CM-494	PIURA	PIURA	3
61	CM-495	PIURA	PIURA	3
62	CM-496	PIURA	PIURA	3
63	CM-497	PIURA	PIURA	3
64	CM-498	PIURA	PIURA	1
65	CM-499	PIURA	PIURA	3
66	CM-500	PIURA	PIURA	3
67	CM-501	PIURA	PIURA	3
68	CM-502	PIURA	PIURA	1
69	CM-503	PIURA	PIURA	1
70	CM-504	PIURA	PIURA	3
71	CM-505	PIURA	PIURA	3
72	CM-506	PIURA	PIURA	2
73	CM-507	PIURA	PIURA	3
74	CM-508	PIURA	PIURA	3
75	CM-509	PIURA	PIURA	3
76	CM-510	PIURA	PIURA	2
77	CM-511	PIURA	PIURA	3

78	CM-512	PIURA	PIURA	2
79	CM-513	PIURA	PIURA	2
80	CM-514	PIURA	PIURA	3
81	CM-515	PIURA	PIURA	3
82	CM-555	AMAZONAS	BAGUA	1
83	CM-558	AMAZONAS	BAGUA	1
84	CM-559	AMAZONAS	BAGUA	1
85	CM-561	AMAZONAS	BAGUA	1
86	CM-563	AMAZONAS	BAGUA	2
87	CM-564	AMAZONAS	BAGUA	1
88	CM-565	AMAZONAS	BAGUA	1
89	CM-566	AMAZONAS	BAGUA	3
90	CM-568	AMAZONAS	BAGUA	3
91	CM-569	AMAZONAS	BAGUA	1
92	CM-570	AMAZONAS	BAGUA	3
93	CM-571	AMAZONAS	BAGUA	2
94	CM-572	AMAZONAS	BAGUA	2
95	CM-574	AMAZONAS	BAGUA	1
96	CM-576	AMAZONAS	BAGUA	1
97	CM-577	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
98	CM-578	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
99	CM-579	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
100	CM-580	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
101	CM-581	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
102	CM-582	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
103	CM-583	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
104	CM-584	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
105	CM-585	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
106	CM-587	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
107	CM-588	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
108	CM-589	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
109	CM-590	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
110	CM-591	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
111	CM-593	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
112	CM-594	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
113	CM-595	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
114	CM-596	AMAZONAS	CONDORCANQUI	1
115	CM-597	AMAZONAS	BAGUA	2
116	CM-598	AMAZONAS	BAGUA	2
117	CM-599	AMAZONAS	BAGUA	2
118	CM-602	AMAZONAS	BAGUA	2

119	CM-603	AMAZONAS	BAGUA	2
120	CM-604	AMAZONAS	BAGUA	2
121	CM-605	AMAZONAS	BAGUA	2
122	CM-606	AMAZONAS	BAGUA	2
123	CM-608	AMAZONAS	BAGUA	2
124	CM-609	AMAZONAS	BAGUA	3
125	CM-610	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	1
126	CM-611	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	2
127	CM-612	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	2
128	CM-613	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	2
129	CM-614	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	2
130	CM-615	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	2
131	CM-616	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	1
132	CM-617	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	1
133	CM-618	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	1
134	CM-619	AMAZONAS	CHACHAPOYAS	1
135	CM-620	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	2
136	CM-621	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
137	CM-622	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
138	CM-623	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
139	CM-625	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
140	CM-626	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
141	CM-627	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
142	CM-628	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
143	CM-629	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
144	CM-630	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
145	CM-631	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
146	CM-632	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
147	CM-633	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
148	CM-635	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	2
149	CM-636	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	3
150	CM-637	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
151	CM-638	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	2
152	CM-639	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
153	CM-640	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
154	CM-641	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1
155	CM-642	AMAZONAS	RODRIGUEZ DE MENDOZA	1

Anexo 12.

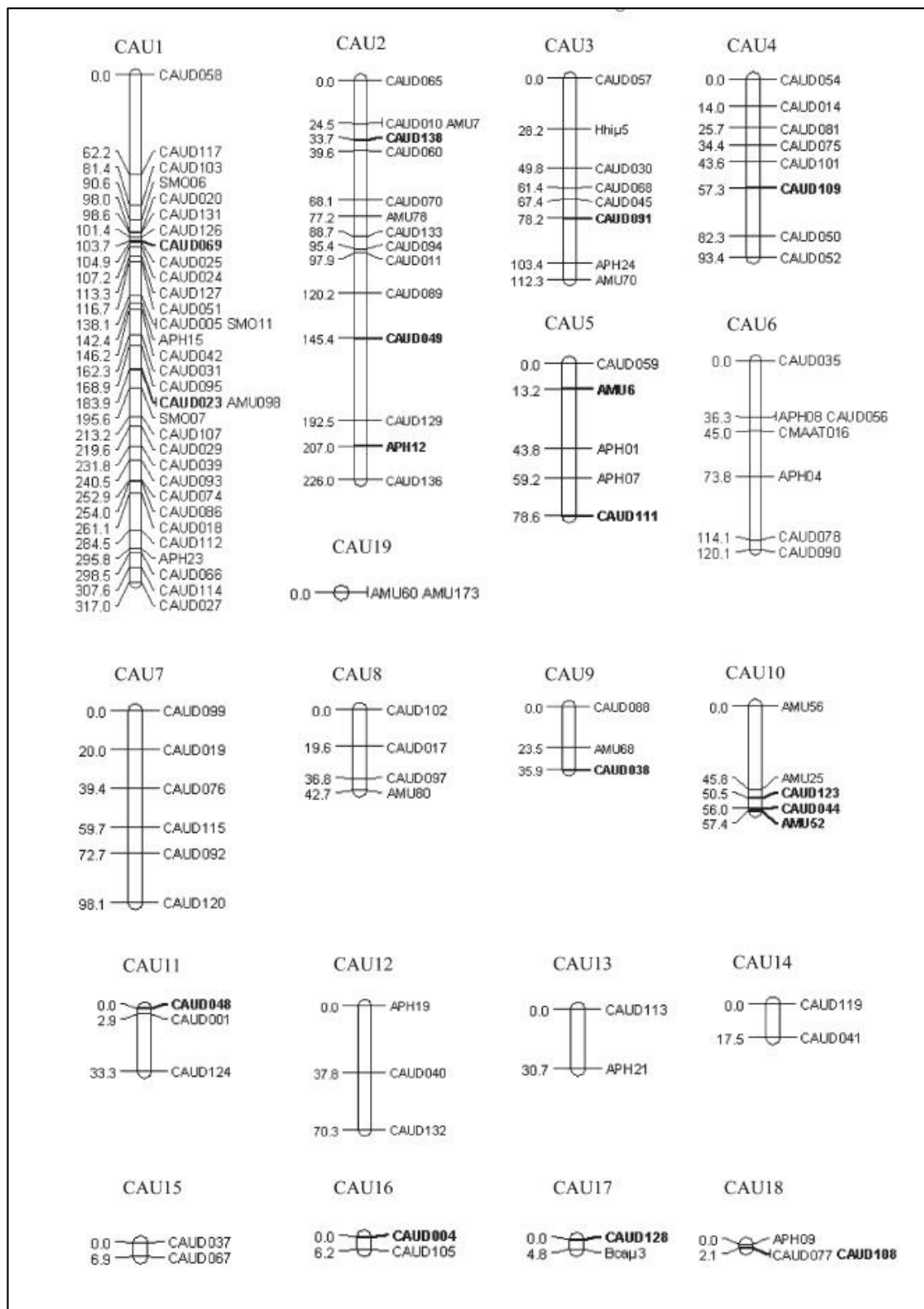


Figura 38. Mapa de ligamiento genético en Kosambi centimorgans para *Anas platyrhynchos*, consistente de 19 grupos de ligamiento conformados por un total de 115 marcadores microsatélites (Fuente: Huang et al., 2006).